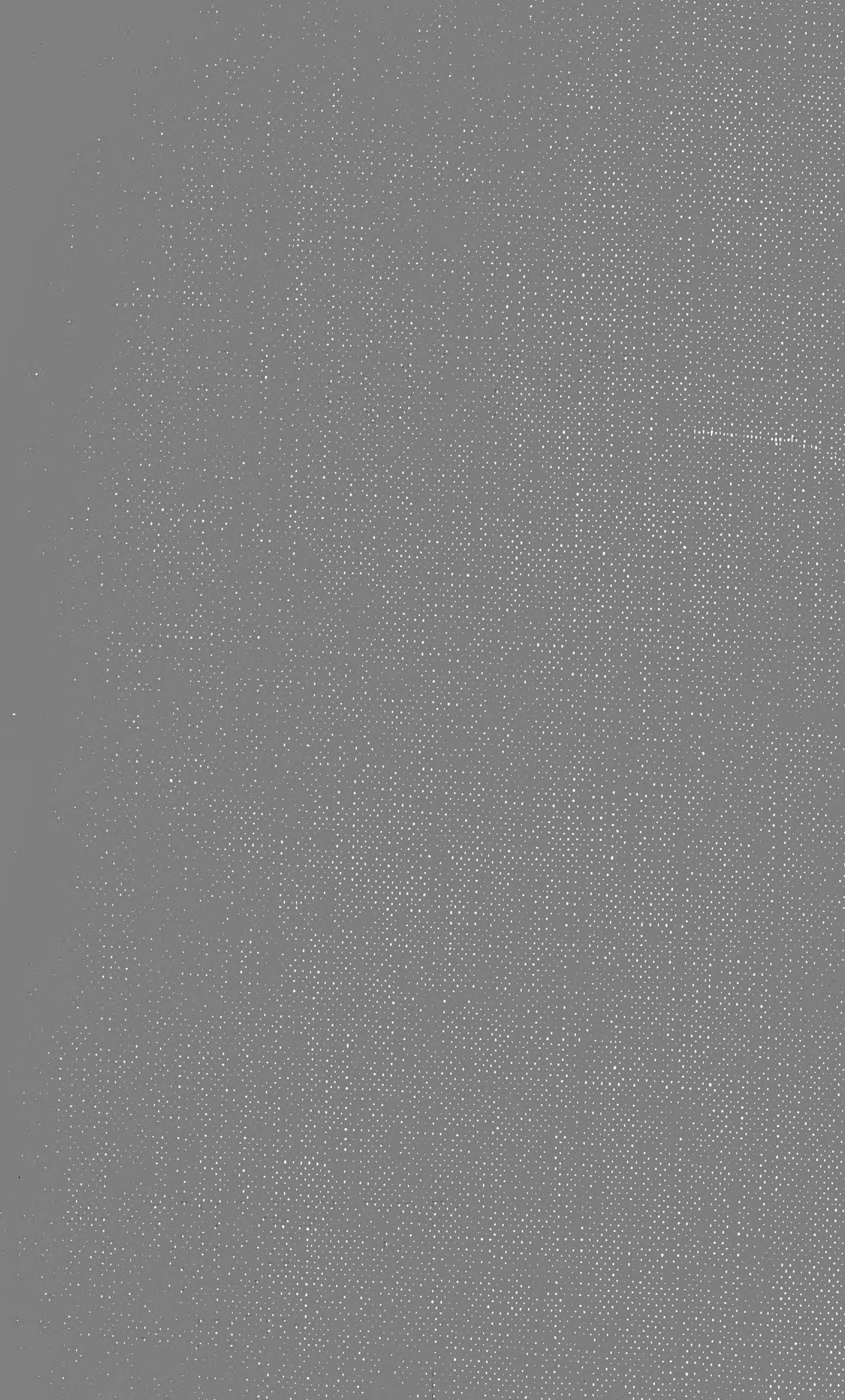


ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

ARIS. — L. MARETHEUX, IMPRIMEUR, 1, RUE CASSETTE.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

TOME TRENTE-DEUXIÈME
1918

AVEC 8 PLANCHES

PARIS
MASSON ET C[ie], ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6e).

32e ANNÉE JANVIER 1918 N° 1

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

THE CHEMICAL MECHANISM OF REGENERATION

by JACQUES LOEB

Member of the Rockefeller Institute for Medical Research, New York.

I

1. — It is known that if a plant or a lower animal is mutilated a new growth may take place by which the organism is once more rendered more or less complete, and this process has been termed regeneration. The regeneration of lost organs proceeds in plants usually from dormant buds near the wound, whose growth is called forth as a consequence of the mutilation. The phenomenon of regeneration has been interpreted in the purely verbal way by attributing to a plant or an animal some kind of feeling for its proper form (Noll's morphæstesia) or by the presence in the organism of a mystical agency, the « entelechy ». Weismann pointed out that regeneration has a selective value since forms endowed with this power were more likely to survive. Others ascribed regeneration to a « stimulating » effect of the wound. These and similar attempts of explaining regeneration need not occupy our attention since they have not led to scientific results.

The earlier biologists, Bonnet and Duhamel, had a more chemical attitude towards the problem, assuming that a plant contained two kinds of sap, an ascending one which carried material for the shoot production, and a descending one carrying material for root production. If the apex is cut off in a plant, the ascending sap collecting near the cut will induce

the growth of shoots from buds, and if the root is cut off, the collection of the descending sap at the base will induce there the growth of roots. Sachs accepted these views and generalized them by assuming as many different specific organ-forming substances in the plant (or animal) as there are organs. These specific substances were said to be present in minute quantities only. This assumption has received some support by recent observations on the effect of internal secretions, especially the thyroid gland.

In his early experiments on regeneration and heteromorphosis in animals the writer was able to point out that the chemical viewpoint of Bonnet, Duhamel and Sachs harmonized very well with his observations. Thus he had found that if a piece is cut from a stem of *Tubularia* (a hydroid) and suspended in sea water, a head (hydranth) will form at either end of the stem, but the head will form much more rapidly at the oral than at the aboral end of the piece; the difference may amount from a few days to a few weeks. Suppression of the head formation at the oral end (by withdrawal of oxygen at that end) accelerated the formation of the head at the aboral end, so that the latter often formed as early as the oral head in the pieces with normal oxygen supply. This is intelligible on the assumption that the head formation is determined by substances which normally flow towards the oral end of an excised piece of stem until a head has been formed, and that afterwards the direction of the flow is reversed; and that if the formation of a head at the oral end is suppressed by the withdrawal of oxygen at this end, the flow is reversed from the beginning and a head can develop at the aboral end as rapidly as the head at the oral end can under normal conditions. This conclusion could be submitted to a test by ligaturing an excised piece of stem of *Tubularia* anywhere between the two ends. This ligature should interrupt the flow of the hypothetical head-forming substances from the aboral towards the oral end, and hence should abolish the cause for the retardation of the head formation at the aboral end; and this was found to be true by Godlewski as well as by the writer (1).

(1) J. Loeb, *La conception mécanique de la vie*, Paris, 1914 et *La dynamique des phénomènes de la vie*, Paris, 1908 (librairie Félix Alcan).

While it was thus possible to show in this and in other cases that the observations on regeneration in animals agree with a chemical theory of regeneration, an adequate proof was lacking; since for this purpose quantitative determinations were required. The fact that the specific organ-forming substances of Sachs were unknown and the statement that they exist only in minute traces in an organism made it appear a hopeless task to undertake quantitative experiments. The writer has recently found that we can investigate the regeneration of the tropical plant *Bryophyllum calycinum* by quantitative methods without having recourse to the hypothetical organ-forming substances of Sachs (1).

2. — The leaves of this plant possess the peculiarity of containing dormant buds in each of their notches (fig. 2) which give rise to roots and shoots as soon as the leaf is separated from the plant, or about to fall off. An explanation of the mechanism of this « regeneration » must also explain the mechanism by which the regeneration is inhibited as long as the leaf is in connection with the whole plant. We shall try to show in this paper that regeneration or rather the growth of the dormant buds in the isolated leaf of *Bryophyllum* takes place as a consequence of the mass action of substances present, or formed in the leaf; and that this regeneration cannot take place as long as the leaf is part of the plant, because the substances needed for « regeneration » in the leaf flow into the stem of the plant. The writer has found a quantitative method by which this idea can be tested.

When a leaf of *Bryophyllum calycinum* is separated from its plant it produces new shoots, not in all of its notches but in only a few; while when the leaf is cut into as many pieces as it contains notches, each notch will give rise to a new shoot. Hence we may ask the question, why do not all the notches grow out in an isolated leaf when it is not cut into pieces? It is obvious that here we are confronted with the problem of inhibition of regeneration in so simple a form that a definite solution can be found.

(1) J. Loeb, *Science*, 1917, XLV, 436; XLVI, 115.

Each node of *Bryophyllum* gives rise to two leaves of equal size. The writer found that when two such sister leaves are isolated and kept under identical conditions they produce in equal time equal masses of shoots, as Table I indicates. Nine pairs of sister leaves were isolated and kept for 31 days on moist filter paper. The one set of nine leaves, weighing 12,022 gm., produced in that time 1,436 gm. of shoots; the nine sister leaves, weighing 11,861 gm., yielding 1,348 gm. of shoots.

Table I.

NUMBER of LEAVES	WEIGHT of LEAVES	SHOOTS PRODUCED BY LEAVES		MGM. OF SHOOTS produced PER GRAM OF LEAF
		NUMBER	WEIGHT	
	gm.		gm.	
9	12,022	24	1,436	119
9	11,861	20	1,348	114

Equal masses of sister leaves produce, therefore, approximately equal masses of shoots in the same time and under equal conditions. In this case the number of shoots in the two sets of sister leaves was not very different; we can easily cause a greater difference in the number by leaving one set of leaves intact and cutting their sister leaves into four pieces. Table II gives the record of such an experiment in which eight pairs of leaves were used; eight leaves were left intact while each of their sister leaves was cut into four pieces. Duration of experiment 35 days.

Table II.

	WEIGHT of LEAVES	SHOOTS PRODUCED BY LEAVES		MGM. OF SHOOTS produced PER GRAM OF LEAF
		NUMBER	WEIGHT	
	gm.		gm.	
8 Leaves, intact	12,917	18	2,831	219
8 Leaves, each cut into 4 pieces .	13,232	33	2,998	226

Although the leaves cut into four pieces produced almost twice as many shoots as their intact sister leaves, both produced approximately the same mass of shoots, namely 2,834 gm. and 2.998 gm. respectively. We may, therefore, state that equal masses of sister leaves produce the same mass of shoots even if the number of shoots differs considerably.

When the pieces into which a leaf is cut become too small, the notches may not regenerate, or, if they regenerate, they may do so with some delay. The mass of shoots produced by such leaves is, therefore, liable to be a little smaller than that produced by their intact sister leaves, though the difference is not great enough to obliterate the law. Table III gives a comparison between the masses of shoots produced in 12 intact leaves and their 12 sister leaves each of which was cut into 8 pieces. Duration of experiment 36 days.

Table III.

	WEIGHT of LEAVES	SHOOTS PRODUCED BY LEAVES		MGM. OF SHOOTS produced PER GRAM OF LEAF
		NUMBER	WEIGHT	
12 Leaves, intact.	gm. 20,200	31	gm. 4,755	230
12 Leaves, each cut into 8 pieces.	20,135	94	3,982	200

The mass of shoots produced by the intact leaves is only slightly greater than that produced by their sister leaves, each of which was cut into 8 pieces.

3. — In all these experiments the masses of the two sets of sister leaves were approximately equal. It was necessary to find out how the mass of shoots would vary if the masses of the two sets of leaves varied considerably. For this purpose large pieces were cut out of the center of one set of leaves, while their sister leaves remained intact. It was found that the mass of shoots produced in the two sets of leaves varied approximately with the mass of the two sets of leaves. Table IV

gives the results. The leaves dipped with their apices into water.

Table IV.

	WEIGHT of LEAVES	SHOOTS PRODUCED BY LEAVES		MG. OF SHOOTS produced PER GRAM OF LEAF
		NUMBER	WEIGHT	
1. (37 days) :	gm.		gm.	
5 Leaves with center cut out.	7,61	11	7,61	99
5 Sister leaves, intact	13,80	9	13,80	101
2. (25 days) :				
7 Leaves with center cut out.	9,899	21	1,213	123
7 Sister leaves, intact	16,935	25	1,995	118
3. (32 days) :				
9 Leaves with center cut out.	10,522	22	2,292	218
9 Sister leaves, intact	17,852	30	3,430	192

These experiments show that if we reduce the mass of one set of leaves by cutting out pieces in the center, while their sister leaves remain intact, both sets will produce in equal time and under equal conditions shoots in proportion to their masses. This law explains the inhibition of shoot production in a leaf. Observation shows that, when we isolate a leaf of *Bryophyllum calycinum*, those notches will as a rule grow out first into shoots where the leaf is thickest; as soon as these grow out the rest of the notches is prevented from growing, inasmuch as all the material available in the leaf now flows into the notches where shoots first begin to grow out. This withdrawal of the material from the other notches determines the inhibition of growth in these notches, since the material available at any time for shoot production is, as we have seen, limited and fixed by the mass of the leaf. When we cut a leaf into as many pieces as there are notches, they may all regenerate since no other notch can withdraw the material available for the growth of each.

We have it entirely in our power to decide which notch in a newly isolated but intact leaf shall grow out first; all we need to do is to dip that notch into water. We do not know definitely how the increase in water supply can accelerate the growth of a notch, though we may guess that an acceleration

of a hydrolytic process may be involved. By thus accelerating the rate of shoot production in a notch we suppress at the same time the growth of the other notches of the same leaf, inasmuch as the available material in the leaf will now flow into the growing shoot. How it happens that the material in the leaf flows to that notch or those notches which by chance first give rise to shoots can only be guessed for the present, and may, therefore, be omitted from the discussion.

The new shoots formed in the notches may be considered as parasites living on the leaf and finally consuming it completely. In all cells hydrolytic processes go on, until a definite chemical equilibrium is reached between hydrolytic and synthetic processes. The hydrolytic processes furnish the amino-acids, sugar, and other constituents needed for the growth of roots and shoots from the notches. In two sister leaves these hydrolytic processes will take place at the same rate as long as the conditions remain alike, and from this we can understand why in two sister leaves the production of shoots proceeds in proportion to the mass of the two leaves. It is probable that the assimilation in the leaf also contributes to the quantity of material available for shoot production. This seems to follow from the fact that in the dark the rate of shoot production in a detached leaf is considerably diminished.

II

It had been observed by Wakker that when a piece of stem is left attached to a leaf of *Bryophyllum calycinum* the shoot production in the leaf may be inhibited (fig. 1) and the observation has been confirmed by de Vries and by Gœbel. Wakker attributed this inhibition to the « pressure » of the roots formed on the piece of stem, but it can be shown that the inhibition takes place also when the root production is prevented in such a piece of stem. Te suppression of shoot formation in a leaf by a piece of stem attache to it should find its explanation on the same principle which was proved in the first part of this paper : namely, the withdrawal of the material needed for regeneration from the leaf by the stem. In order to test this idea we again need quantitative methods.

When we cut from a stem a piece containing one node,

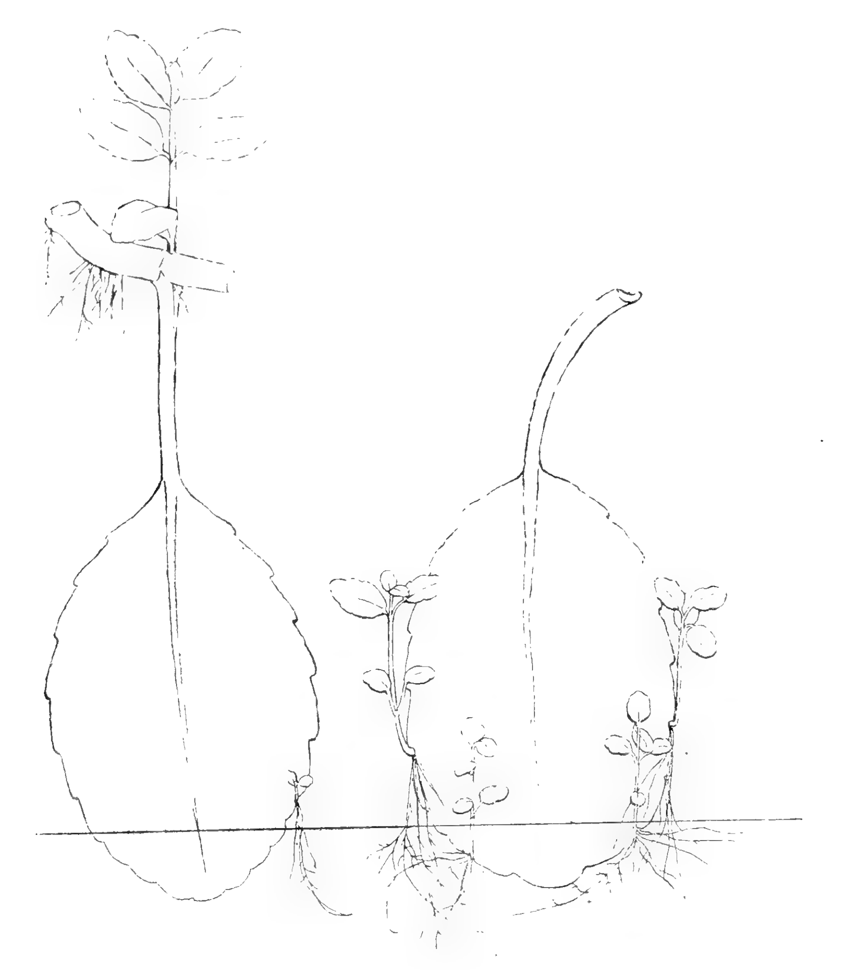


Fig. 1. Fig. 2.

Figs. 1 and 2. — Sister leaves dipping with their apices in water. Leaf in fig. 2, without stem, has formed four shoots in four different notches. Leaf in fig. 1, attached to a piece of stem, has just commenced to form one tiny shoot in one notch. The material wich caused shoot production in leaf 2 was utilized by the stem in leaf 1 for the production of a large shoot on the stem, for callus formation at the basal end of the stem, and for a slight geotropic curvature. The drawing was made seven weeks after the beginning of the experiment.

detach one of the two leaves, leaving the other leaf attached to the piece of stem (figs. 1-2), and allow both leaves to dip

with their apices into water, both leaves may form shoots but the mass of shoots produced by the two sister leaves is no longer equal. The leaf with a stem attached will produce a smaller quantity of shoots than the leaf without stem, and the difference in the mass of shoots produced by the two sister leaves can serve as a measure for the inhibiting effect of the piece of stem upon shoot production in the leaf. By this method it was found that if the masses of leaves are equal the inhibiting power of the stem increases with its size or mass. Table V may serve as an example.

Table V.

LENGTH of STEMS	WEIGHT of STEMS	WEIGHT of LEAVES	WEIGHT OF SHOOTS PRODUCED IN		INHIBITING ACTION OF STEM
			LEAVES without stems	LEAVES with stems	
cm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.
1	1,960	40.5	2,361	1,677	0,684
6	15,127	43.0	2,656	0,441	2,215

Sixteen pairs of sister leaves were chosen, 16 leaves were attached each to a (half) (1) stem 1 cm. long; the 16 sister leaves had no stem attached. The latter produced in 17 days 55 shoots weighing 2,361 gm., the former 42 shoots weighing 1,677 gm. The inhibiting effect of the 1 cm. half stem upon shoot production in the leaf was, therefore, 2,361 — 1,677 = 0,684 gm. In a parallel experiment 14 pairs of sister leaves weighing almost exactly as much as the leaves in the first experiment were used; 14 leaves were attached each to a half stem 6 cm. long, while the sister leaves had no stem attached. The latter produced in 17 days 49 shoots weighing 2,656 gm., while the leaves with stems produced only 16 shoots weighing 0,441 gm. The inhibiting effect of the 6 cm. stem upon shoot production in the leaves

(1) It will become clear later on what is meant by half stem.

was, therefore, 2,656 — 0,441 = 2,215 gm., almost 4 times as much as that of the 1 cm. stem. The 1 cm. half stems weighed fresh 1,960 gm., the 6 cm. half stems 15,127 gm. *Hence the inhibiting power of the stems upon shoot production in the leaf increases with the length and mass of the stem but not as rapidly.*

Other experiments gave similar results.

The main problem before us was to decide the question whether or not the inhibiting effect of the stem upon shoot production in the leaf is due to the absorption by the stem of that material from the leaf which would have served for the shoot production in the latter, had it been detached from the stem. If this were the case it should be possible to show that the stem attached to a leaf increased in weight enough or more to account for the diminution of shoot production. In order to test this idea the following method was adopted. A piece from the stem of *Bryophyllum* containing one node with its two leaves, was cut out from a plant and the stem split longitudinally in the middle between the two leaves, leaving one half of the stem attached to each leaf. The half stem was removed from one leaf and weighed directly. The leaf whose half stem was cut off and the other leaf, with a half stem still attached to it, served for the experiment. After several weeks the stem was removed from the second leaf and weighed. It was invariably found that the stem had increased in weight to an amount exceeding the diminution in the production of shoots in the leaf attached to it.

While in the experiments mentioned in the first part of this paper, the fresh weights of the shoots were used for comparison, it was found necessary in this case to use the dry weights. It was found that, while the ratio of fresh and dry weight of shoots and leaves is fairly constant under the conditions of the experiments of the first part of this paper, this is no longer the case for the split stems. The percentage of dry weight in a split stem is smaller immediately after the stem is cut out of a plant than after it has been suspended in moist air for several weeks. Since the results of the experiment depend upon a comparison of the weight of a half stem when taken fresh from the plant and after some weeks, only the dry

weights can give accurate results. In the following three sets of experiments, Tables VI and VII, the mass of each set of leaves was approximately the same, namely about 28 gm. fresh weight for 12 leaves. What interests us is, first, the difference in the dry weight of shoots produced in the leaves without and the leaves with half stems, second, the increase in the dry weight of the half stems left attached to the leaves during the experiment. According to our theory this latter increase should be equal to or greater than the difference in the shoot production in the two leaves. Each set of experiments was carried out with 12 pairs of sister leaves. In these experiments the leaf was always at the apex of the piece of stem, since it was found that the leaf sends its material into the basal part of the stem attached to it. The experiments lasted 29 days.

Table VI.

NUMBER of EXPERIMENT	LENGTH of STEM	DRY WEIGHT OF SHOOTS PRODUCED IN		DIFFERENCE (inhibiting effect OF STEM on shoot production in leaf)
		LEAVES without stems	LEAVES with stems	
	cm.	gm.	gm.	gm.
I	2	0,2156	0,0256	0,0918
II	4	0,2674	0,0558	0,2116
III	8	0,1662	0	$\geqq$ 0,1662

Table VII gives the increase in weigt in the half stems during the experiment.

We see from Table VI that the 2 cm. stems reduced the shoot production in the leaves by 0,1238 gm. (dry weight). Table VII shows that the stems gained in the same time 0,2448 gm. in dry weight. Since this gain could have no other source than the supply of material from the leaf, the experiments make it probable that the suppression of shoot production in the leaf is caused by the absorption of material from the leaf by the stem. In experiment II the stems were twice as long as in experiment I and hence we notice that these

stems reduced the shoot production in the leaf more than the shorter stems in experiment I, namely 0,2116 gm. dry weight. Hence we should expect to find that the larger stem in experiment II had also gained more in mass than the shorter stem in experiment I, and this was the case. The gain in mass of the stems was 0,3382 gm. dry weight. In the third experiment the 8 cm. long stems suppressed the shoot production in the leaf completely, but the control leaves produced a considerably smaller mass of shoots (0,1662 gm. dry weight) than the control leaves in the two previous experiments, although the experiments were made simultaneously and at identical temperatures. It is possible that the illumination was not adequate or that the leaves were not in as good a condition as the others. The stems in this experiment gained also less than the shorter stems in experiment II, namely 0,3172 gm.

Table VII.

NUMBER of EXPERIMENT	LENGTH of STEM	DRY WEIGHT OF HALF STEM		INCREASE in dry weight OF STEM
		AT BEGINNING of experiment	AT END of experiment	
	cm.	gm.	gm.	gm.
I	2	0,1592	0,4040	0,2448
II	4	0,3640	0,6866	0,3382
III	8	0,8290	1,1462	0,3172

These and similar experiments show, first, that the inhibition of shoot production in a leaf by a piece of stem attached to it is accompanied by an increase in the mass of the stem, and, second, that this latter increase varies in the same sense as the inhibiting effect of the stem upon shoot production in the leaf. In view of this fact and in view of the facts given in the first part of this paper it seems, therefore, highly probable that the inhibiting action of the stem upon the shoot production in the leaf is due to the absorption of material from the leaf by the stem.

It might be argued that our experiments would be more satisfactory if the increase in the amount of dry weight of the stem were exactly equal to its inhibiting effect upon the shoot production in the leaf instead of being in excess. Yet, the result we actually obtained is exactly the one which in the nature of the circumstances should be expected, since the leaf « naturally » sends its material into the stem and as a consequence the stem can draw from the leaf material more rapidly than can be done by notches of the leaf. When the notches begin to grow out new channels for the flow of sap to them will gradually have to be developed, while such conducting vessels or channels from leaf to stem are a part of the normal leaf. These ideas are supported by a number of observations. Thus it can be shown that the shoots which form in the free bud of a stem, as in Fig. 1, develop more quickly than the shoots in the notches of a leaf, even if the apex of the latter dips into water, thus indicating that the material of the leaf collects more rapidly in the stem than in the notches. Moreover, a piece of stem of a certain size will inhibit the shoot production in the notches of a leaf completely when the leaf is small, while the inhibition will be less complete when the leaf is larger. If the chances for the flow of material to the notches were the same as for the flow to the stem we should expect to find a constant coefficient of distribution of material between notches and stem which is not the case.

Finally, the stem not only inhibits shoot production in the leaf but also root production. If this is due to the absorption of material by the stem the latter should gain more than the equivalent of the inhibiting effect on shoot production alone.

III.

The proof that the dry weight of a piece of stem left in connection with a leaf increases more than necessary to account for the inhibitory effect of the stem upon shoot production in the leaf, becomes of great significance when we investigate what becomes of this material in the stem. We notice that it is utilized for at least three different forms of growth in the stem, namely, first, the formation of shoots from the dormant

buds in the stem, second, the callus formation at the basal end of the stem, and, third, the geotropic curvature of the stem, all three of which may be observed in the same piece of stem attached to a leaf, as is the case in Fig. 1. When we cut a piece of stem with one leaf attached to it (as in Fig. 1) from a plant, such a stem will form a shoot from its free bud (in the axil of the leaf which was removed), and the mass of this shoot may equal or even slightly exceed the mass of shoots produced by the sister leaf which is not attached to a stem (as in Fig. 2). We can easily understand that the same material may be utilized for shoot production in the leaf and in the stem. But in addition such a stem produces a mass of callus at its basal end, the material for which also comes from the leaf. And finally, a third form of growth takes place in the stem at the expense of material from the leaf and this results in geotropic curvature.

The connection between geotropic curvature of a stem and the mass of the leaf connected with it can be demonstrated and since this relation is a recent discovery (as far as the writer is aware) it may be briefly discussed. The writer found a year ago that, if a piece of stem is cut out from *Bryophyllum* and suspended horizontally in moist air, the stem will gradually bend until it finally assumes the shape of a U with the concave side above (Fig. 3). It was found that this geotropic curvature is due to a longitudinal growth of a certain layer of cells in the cortex on the lower side of a horizontally placed stem; as a consequence of this growth the whole stem bends in the way described.

Now if our assumption is true that the inhibiting effect of the stem is due to the absorption of that material from the leaf which would have served for regeneration in the leaf ; and that this material is utilized for the growth of certain cells in the stem, we should be able to show that the geotropic curvature increases with the mass of the leaf attached to the apical end of the stem. Our experiments show in a striking way that this is correct.

Stems, each of which having a leaf at the apical end were suspended horizontally in moist air; the leaves and stems were approximately equal in size. The leaves of one set were

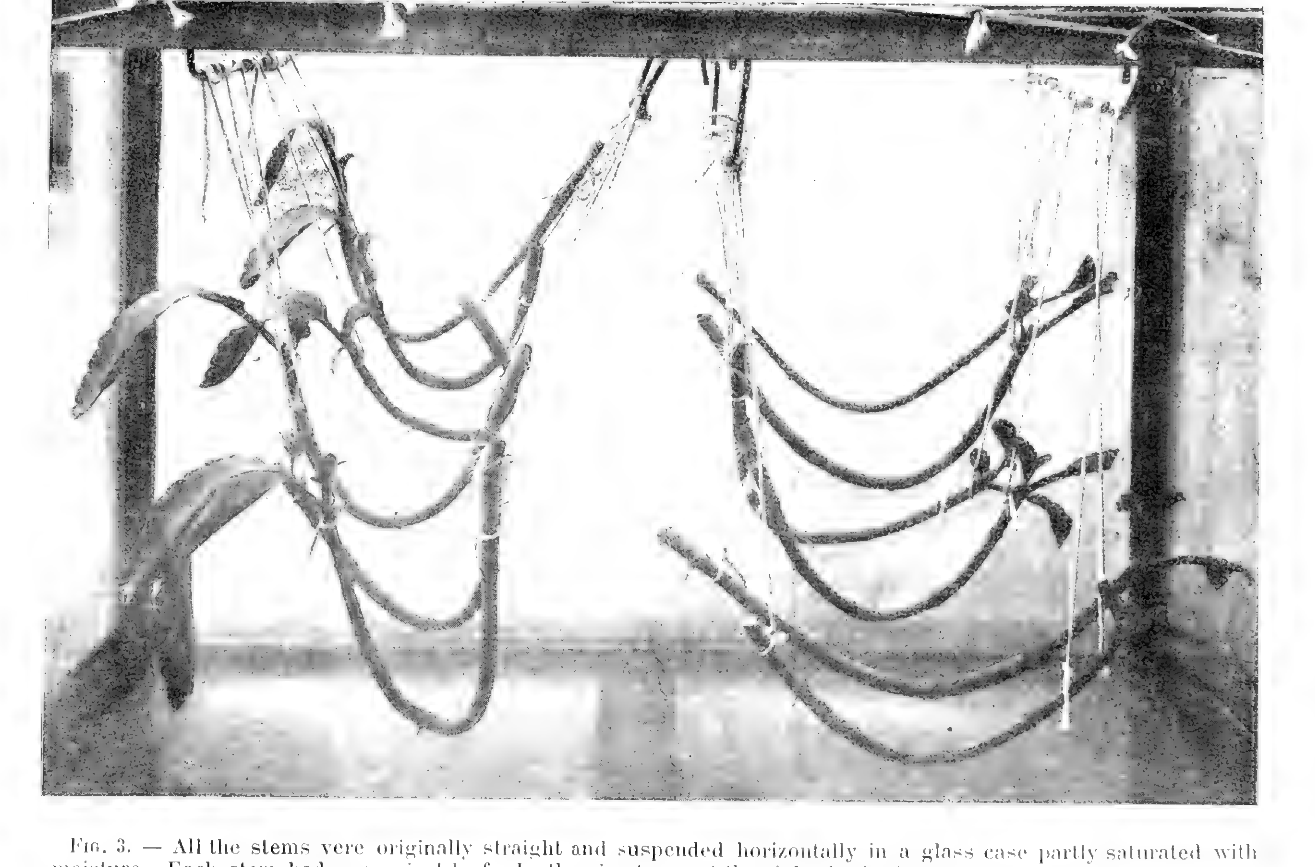


Fig. 3. — All the stems vere originally straight and suspended horizontally in a glass case partly saturated with moisture. Each stem had one apical leaf. In the six stems at the right the leaf was reduced in size, while in the six stems at the left the size of the leaf was normal. The rate of geotropic curvature was considerably smaller in the stems at the right than in the stems to the left, showing that the rate of geotropic curvature increases with the mass of the apical leaf. The photograph was taken three weeks after the beginning of the experiment.

left intact while the mass of the leaves of the second set was reduced by cutting pieces out from the middle of the leaf. It was found that the rate of geotropic bending in the latter leaves was considerably slower than in the leaves with larger mass (Fig. 3). No matter in which way the mass of the leaf was reduced the rate of bending varied in the same sense as the mass of the leaf. Fig. 3 is a photographic reproduction of such an experiment. The leaves of the stems on the left side were intact, the mass of the leaves of the stems on the right side of the photograph was diminished by cutting off the front part of the leaves. Both sets of stems were straight at the beginning of the experiment and both sets were suspended simultaneously. The stems on the left, with the larger leaves, are bent more strongly than those with smaller leaves on the right. We have seen in the first part of this paper that the shoot production in a leaf varies with its mass. The geotropic curvature of a stem of *Bryophyllum* also varies with the mass of the apical leaf attached to it, no matter which part of the leaf is cut off. This supports the idea that the geotropic curvature of the stem occurs at the expense of that material which exists or is formed in the leaf and serves for the formation of shoots by the leaf when the latter is detached from the stem.

We can now anderstund why « regeneration » occurs when the leaf of *Bryophyllum* is separated from the plant and why it cannot occur as long as the leaf forms part of the whole organism.

The writer is under the impression that further quantitative experiments will put the problem of regeneration into the category of the phenomena of nutrition or mass action. Regeneration appears mysterious only as long as we do not perceive or measure the change in the distribution of the masses of the nutritive material, which must occur when a part is cut out from a whole organism.

RECHERCHES SUR LA FLORE INTESTINALE
CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES MICROBES PRODUCTEURS DE PHÉNOL
PRINCIPAUX CARACTÈRES DU *BACILLUS PHENOLOGENES*

par ALBERT BERTHELOT.

Si nombreuses que soient les preuves cliniques et expérimentales du rôle néfaste de l'auto-intoxication intestinale, bien des cliniciens le mettent encore en doute. Les poisons sans cesse élaborés par les microbes de notre tube digestif leur semblent incapables d'une action nuisible parce que, même chez les sujets qui accusent des phénomènes de putréfaction intestinale très intenses, ils ne sont produits qu'en très faible quantité. Le phénol et le *p*-crésol, en particulier, leur paraissent sans aucun intérêt à cause de la faiblesse relative de leur toxicité immédiate et surtout du peu d'énergie avec laquelle se manifeste le pouvoir phénologène des hôtes habituels de notre intestin.

M. Metchnikoff a pourtant montré que, même à très petites doses, le *p*-crésol sclérose les artères, les reins et le foie pourvu que son action soit prolongée très longtemps. Ce sont précisément de telles conditions de quantité et de durée que réalise l'auto-intoxication intestinale ; aussi conçoit-on difficilement qu'on puisse ne pas croire à ses méfaits. On objecte, notamment, que les puissants moyens de défense dont dispose notre organisme luttent sans cesse contre ce léger empoisonnement permanent. Mais leur activité incessante n'est pas sans les altérer à la longue ; peu à peu, plus ou moins vite, leur capacité de neutralisation, de destruction ou d'élimination diminue et l'auto-intoxication intestinale, sans qu'elle s'aggrave quantitativement, augmente de plus en plus d'importance au

point de vue de son rôle pathogène. A mesure que s'usent nos organes, la portée du facteur continuité d'action s'affirme davantage et il arrive un moment où l'influence nuisible des très petites quantités de poisons produites par la flore de notre tube digestif cesse d'être insignifiante.

Ces quantités sont-elles toujours aussi minimes que l'admettent la plupart des auteurs? Jusqu'à ce jour, les faits nous le laissaient croire, car les microbes connus comme producteurs de phénol n'en donnent que des traces, dans les conditions les plus favorables. Dobrowolsky (1), qui a repris assez récemment l'étude de cette question, conclut de ses recherches que « la propriété des microbes de fabriquer du phénol est très peu marquée dans les cultures pures » ; bien qu'il ait examiné un assez grand nombre d'espèces, il n'a trouvé comme forts producteurs que les « bacilles *paracoli*, de H. Tissier (nos 91 et 94) », qui ne lui ont fourni, du reste, que 23 et 18 milligrammes de phénol par litre de milieu après dix jours de culture à 37°. Parmi les autres représentants de la flore intestinale, il n'y eut que quelques autres *B. paracoli*, quelques *B. coli*, *B. proteus* et *B. putrificus coli*, qui produisirent du phénol; encore ne lui en donnèrent-ils, *au maximum*, que 3 milligrammes par litre de milieu.

Les auteurs qui ne croient pas à l'importance pathogène des hôtes habituels de l'intestin trouvaient donc, dans les travaux mêmes des bactériologistes, des arguments en faveur de leurs critiques; à l'avenir, ces arguments leur manqueront, car les faits que je vais exposer ont ébranlé la base sur laquelle ils reposaient.

Il y a quelques années, j'ai montré qu'en se guidant sur les données chimiques que nous possédons sur l'origine des principaux poisons formés dans le tube digestif, il est possible d'isoler de la flore intestinale des espèces montrant une affinité particulière pour les produits ultimes de la digestion des protéiques, espèces parmi lesquelles se trouvent naturellement les plus grands producteurs de produits toxiques. A condition d'opérer sur un assez grand nombre d'échantillons, il suffit,

(1) Dobrowolsky, Des microbes producteurs du phénol. *Annales de l'Institut Pasteur*, juillet 1910, t. XXIV, p. 595.

en effet, d'ensemencer, avec une trace des matières fécales, un volume suffisant d'un milieu ne contenant comme aliment organique qu'une petite quantité d'un acide aminé, pour obtenir, rapidement, en quelques passages, une culture pure d'un microbe attaquant l'aminoïque employé et souvent d'une manière spécifique (1).

Le phénol et le *p*-crésol, qui apparaissent dans les putréfactions, se formant aux dépens de la tyrosine, constituant important de la plupart des molécules albuminoïdes, il paraissait évident, *a priori*, que ce serait parmi les microbes pour lesquels cet acide aminé est un aliment d'élection qu'on trouverait les plus forts producteurs du phénol. Dès mes premières recherches, j'ai constaté qu'il en était bien ainsi et deux des premières bactéries acidaminolytiques que j'ai isolées donnaient en quinze jours, dans une solution nutritive à base de tyrosine, assez de phénol pour que j'aie pu, avant toute recherche chimique, reconnaître la présence de ce corps à l'odeur caractéristique que répandaient les cultures.

Ces deux microbes étaient extrêmement voisins, mais je n'ai pu étudier complètement que l'un d'eux, ayant perdu l'autre accidentellement après quelques repiquages. Le milieu que j'avais employé pour l'isolement présentait la composition suivante :

Eau	1.000
SO^4K^2	0,20
SO^4Mg	0,20
PO^4K^2H	0,50
AzO^3K	0,25
$CaCl^2$	0,02
Tyrosine	2,00

La tyrosine était l'acide aminé naturel, lévogyre, résultant de la purification du produit obtenu dans la digestion pancréatique de la viande ; par suite de sa très faible solubilité dans l'eau froide, elle restait en grande partie non dissoute dans la liqueur.

(1) ALBERT BERTHELOT. Recherches sur la flore intestinale. Isolement des microbes qui attaquent spécialement les produits ultimes de la digestion des protéiques. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 24 juillet 1911, t. CLVI. Consulter également : *Presse médicale*, 19 avril et 6 août 1917 (Technique de la vaccinothérapie de certaines entérites chroniques).

Dans cette solution nutritive, en quinze jours, à 37°, la production de phénol atteignit 797 milligrammes par litre. L'intensité du pouvoir phénologène n'étant peut-être que la conséquence d'une adaption au milieu intestinal et me paraissant susceptible de diminuer au cours des passages en milieux usuels, je ne pris note, à ce moment, que des principaux caractères du microbe que je venais d'isoler et je remis à plus tard son examen détaillé. Les auteurs qui ont étudié les bactéries productrices de phénol ont surtout observé des espèces accoutumées depuis longtemps aux milieux artificiels et dont les propriétés pouvaient, par conséquent, se trouver assez différentes de ce qu'elles étaient à l'origine ; en ne me plaçant pas dans des conditions analogues, je me serais exposé à décrire les caractères encore mal fixés d'un microbe déjà connu.

J'ai donc réensemencé tous les trois mois, par piqûre en gélose et en gélatine, le microbe phénologène que j'avais isolé en juin 1911, et ce n'est qu'en janvier 1914 que j'ai repris l'étude de ses caractères dont voici l'exposé :

Origine. — Matières fécales d'un sujet, âgé de trente ans, présentant depuis dix ans des signes d'appendicite chronique avec colite muqueuse.

Mode d'isolement. — Trois repiquages dans un milieu électif où la tyrosine représentait le seul élément organique. Séparation des colonies sur le même milieu gélosé.

Forme et disposition des éléments (Fig. I, 1). — Petit bacille large et court, presque ovoïde (cocco-bacille). Dans les jeunes cultures sur gélose inclinée, assez forte proportion d'éléments deux fois plus longs que larges avec une ébauche d'étranglement au milieu ; très rarement éléments encore un peu plus longs.

En bouillon les petites formes dominent ; un très grand nombre sont agglutinées en amas se dissociant difficilement.

Motilité. — Mobilité extrêmement faible, presque insensible même à l'ultramicroscope.

Cils (Fig. I, 2). — La petite forme normale, cocco-bacillaire, présente à une de ses extrémités un cil long et très fin ; certains éléments en ont deux, un à chaque pôle. Les formes longues en présentent quatre à six, un à chaque extrémité, deux de chaque côté.

Capsule. — Jamais de capsule, même dans les exsudats des animaux inoculés.

Spores. — Pas de sporulation, même dans les vieilles cultures sur gélose pauvre en substances nutritives.

Caractères de coloration. — Ne prend pas le Gram et se colore très facilement par les couleurs d'aniline.

Dimensions des éléments. — Les formes normales mesurent de 0µ3 à 0µ5 de largeur sur 0µ4 à 0µ8 de longueur.

Action de l'oxygène. — Anaérobie facultatif.

Température optima. — 37°.

Température mortelle. — Les cultures en bouillon, en ampoules de 1 cent. cube, sont stérilisées par un chauffage de quinze minutes à 55°.

Caractères des cultures :

Bouillon ordinaire. — Trouble du milieu, flocons facilement dissociables. Dépôt abondant. Collerette peu apparente.

Bouillon Martin. — Milieu à peine trouble, abondant dépôt floconneux.

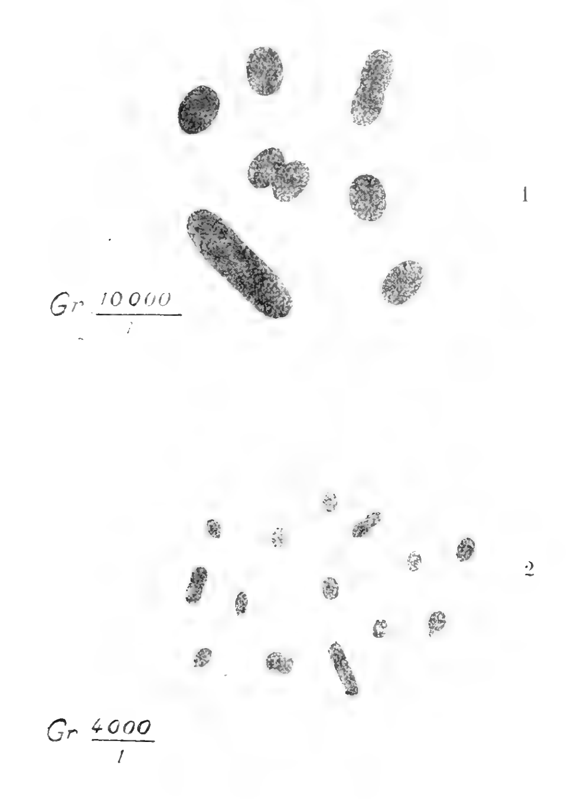


Fig. I. — *Bacillus phenologenes.*

1, Forme et disposition des éléments. — 2, Disposition des cils.

Bouillon glucosé. — Mêmes caractères qu'en bouillon Martin.

Bouillon de légumes (Carotte, Navet, Pomme de terre). — Trouble très marqué avec dépôt lourd et abondant.

Bouillon ascite. — Après vingt-quatre heures à 37°, trouble à la partie supérieure; après trois jours, léger voile et collerette, trouble floconneux dans la moitié supérieure, au fond des tubes dépôt adhérent abondant.

Bouillon sérum. — Trouble du milieu, dépôt floconneux bien aggloméré.

Bouillon lactique à 2 p. 1.000. — Au troisième jour milieu clair, mais abondant dépôt formé de grumeaux se dissociant mal.

Lait tournesolé. — La coagulation avec très légère acidification se produit seulement le troisième jour à 37°.

Gélose (Fig. II, 1, 2, 3). — En strie sur gélose inclinée, la culture à 37° présente l'aspect d'un enduit transparent, peu épais, blanchâtre par réflexion,

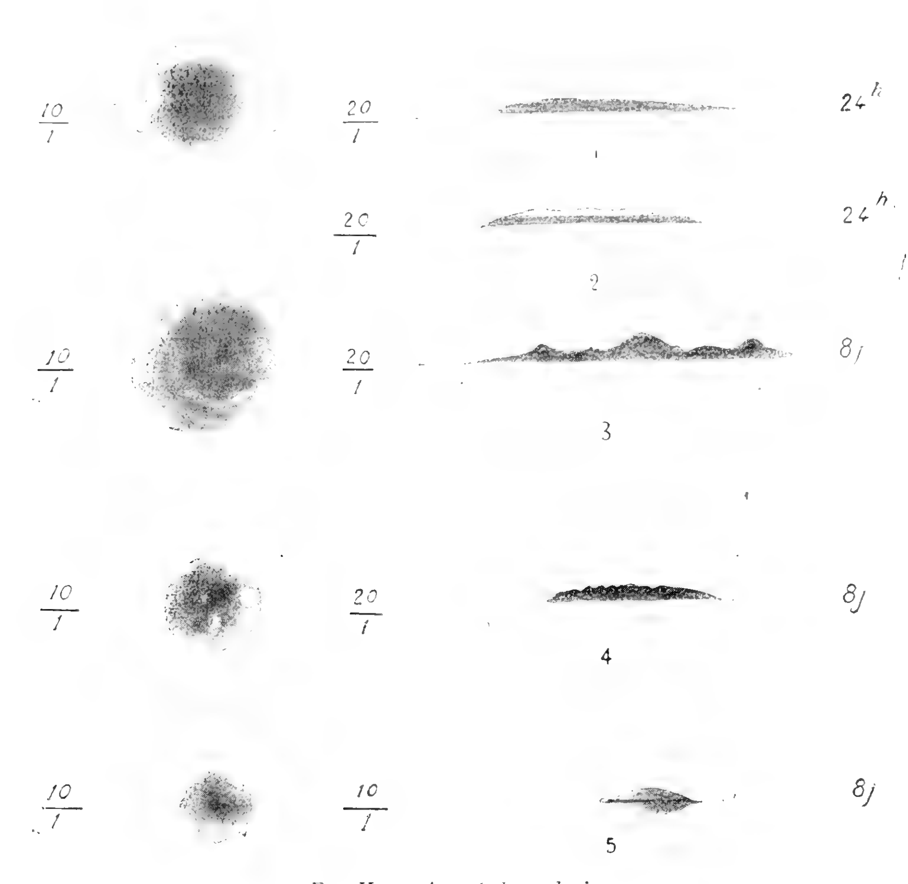


Fig. II. — *Aspect des colonies.*

Milieu de culture : 1, Gélose sèche. — 2, Gélose humide. — 3, Gélose sèche. — 4 et 5, Gélatine.

A gauche, vue en place.

A droite, 1, 2, 3, 4, coupes; 5, vue d'une colonie incluse dans la gélatine à 15 millimètres au-dessus de la surface.

légèrement teinté de brun par transparence. La surface est sèche, rugueuse; les bords festonnés sont amincis, mais à pente raide.

En piqûre, culture en clou comme pour la gélatine.

Sur plaques ou sur gélose inclinée, à 37°, les colonies atteignent en vingt-quatre heures un diamètre variant entre 0mm75 à 2mm5. Leur forme n'est pas très

régulière; certaines, les jeunes surtout, sont presque circulaires, mais la plupart sont à bords festonnés, irrégulièrement découpés. Elles sont presque transparentes, très légèrement teintées de brun, surtout vers le centre qui est un peu plus épais que les bords; par réflexion elles sont blanc grisâtre, leur surface semble sèche et un peu rugueuse.

Gélatine (Fig. II, 4, 5). — Sur plaques, à 22°, les colonies de la surface atteignent en huit jours un diamètre moyen de 1 millimètre. Elles sont assez régulièrement circulaires, d'un blanc grisâtre, leur épaisseur s'accroît légèrement de la périphérie vers le centre et leur surface est d'apparence rugueuse. Dans l'épaisseur de la gélatine elles restent toujours plus petites, sont faiblement teintées de brun et de forme lenticulaire.

En piqûre le développement se fait en clou; la culture est d'un blanc grisâtre et envahit à la longue toute la surface libre du milieu. En aucun cas, il n'y a liquéfaction de la gélatine.

Gélose ascite inclinée. — En vingt-quatre heures, à 37°, colonies opalescentes très transparentes de forme identique à celles sur gélose ordinaire.

Gélose au sang inclinée. — En strie le développement s'effectue sous forme d'un enduit abondant à surface rugueuse et d'un blanc jaunâtre sale.

Sérum coagulé. — En quarante-huit heures, à 37°, culture grisâtre peu abondante limitée à la strie d'ensemencement.

Pomme de terre. — Léger enduit blanchâtre s'étendant très peu autour du point d'ensemencement.

Bouillon de haricots (*Mazé*). — En vingt-quatre heures, à 37°, trouble floconneux, collerette, dépôt abondant.

Urine humaine. — En vingt-quatre heures développement abondant avec collerette.

Gélose de Conradi-Drigalski. — Colonies rondes, blanc grisâtre rosé, d'aspect sec et à surface légèrement rugueuse. Elles présentent sensiblement la forme d'une calotte sphérique très aplatie avec une dépression centrale montrant elle-même une légère surélévation à son centre. Auréole rouge peu intense.

Eau peptonée (*Peptone pancréatique Defresne*). — En vingt-quatre heures, voile avec collerette peu apparente, trouble abondant à la partie supérieure avec flocon tombant au fond.

Eau peptonée glucosée à 10 p. 1.000; réaction limite. — Après 15 jours, à 37°, réaction acide correspondant à 1 gr. 225 de SO^4H^2 par litre.

Lactosérum (*présure*). — Trouble léger en vingt-quatre heures, à 37°.

Milieu de Gessard au succinate d'ammoniaque. — Après vingt-quatre heures, à 37°, trouble à peine sensible; au troisième jour, dépôt floconneux avec collerette et voile peu accusés.

Liquide de Uschinsky. — En vingt-quatre heures, à 37°, flocons abondants et collerette.

Caractères biochimiques :

Aucune action protéolytique sur la gélatine, le blanc d'œuf coagulé, le sérum coagulé ou la caséine.

Développement abondant, même au quatrième passage, sur milieux pour l'isolement des acidaminolytiques à base de *l*-tyrosine, de tyrosine racémique, d'histidine, de proline, d'arginine, de lysine, d'alanine ou de leucine. Pas de culture apparente avec le glycocolle, le tryptophane, la phénylalanine, l'acide glutamique ou l'acide aspartique.

Formation de phénol en présence de tyrosine l *et* dl, *de glycyltyrosine, ou de peptone pancréatique de viande Coloration rose des milieux tyrosinés primitive-*

ment incolores. — Aucune production d'indol ou d'acide indol-3-acétique dans les milieux riches en tryptophane (peptone pancréatique de caséine, solutions minérales additionnées de tryptophane). Formation rapide d'hydrogène sulfuré dans les cultures en solution de peptone pancréatique Defresne; la gélose à l'acétate de plomb brunit en quatre jours à 22° et en vingt-quatre heures à 37°.

L'ensemencement dans une solution de peptone de soie (Hoffmann La Roche), à 1 p. 100, provoque en vingt-quatre heures, à 37°, l'apparition d'un léger trouble avec dépôt glaireux; dans une solution à 1 p. 100 des produits abiurétiques résultant de l'hydrolyse diastasique prolongée de la viande, le trouble est plus marqué avec formation de flocons et d'un dépôt grumeleux.

A 37°, en vingt-quatre heures, trouble très léger après ensemencement de solutions nutritives dans lesquelles l'azote est fourni par 2 p. 1.000 d'urée, d'allantoïne, de caféine ou de créatine.

Formation de nitrites dans les cultures en eau peptonée ou en solution minérale nitratées.

Réduction partielle du rouge neutre, avec fluorescence, dans les cultures de vingt-quatre heures en eau peptonée; en quatre jours réduction totale.

Les cultures de quatre jours, à 37°, en eau peptonée additionnée de glucose, de lévulose, de galactose, de saccharose, de lactose, de maltose, de glycérine, de mannite, d'arabinose, de xylose, de mannose, de raffinose, de rhamnose, de glucosamine, d'esculine ou de méthylglucosides α et β présentent une réaction acide au tournesol. Avec la dulcite, l'érythrite, la dextrine, l'amidon, l'inuline, le glycogène, la sorbite, l'inosite, la salicine, l'amygdaline ou l'arbutine, les cultures restent neutres.

Avec l'esculine l'acidification est à peine sensible, mais il y a un abondant dépôt d'esculétine. L'amygdaline et les deux méthylglucosides provoquent la formation d'un voile épais.

Pouvoir pathogène. — Le pouvoir pathogène des cultures totales de vingt-quatre heures, en bouillon, est pratiquement sans importance. En effet, la souris résiste à l'inoculation sous-cutanée de 3 cent. cubes et le cobaye à l'inoculation intrapéritonéale de 2 cent. cubes; le lapin supporte facilement 10 cent. cubes sous la peau, 5 cent. cubes dans le péritoine ou 3 cent. cubes dans les veines. La production de toxine semble nulle, car le cobaye ne présente aucun signe d'intoxication après l'injection intrapéritonéale de 12 cent. cubes ou l'injection intraveineuse de 5 cent. cubes d'une culture en bouillon Martin de dix jours, filtrée sur bougie.

Comme les auteurs qui ne croient pas encore au rôle néfaste de l'auto-intoxication intestinale n'auraient pas manqué de m'objecter que la présence des multiples produits de la digestion devait empêcher la formation de phénol, j'ai cultivé le *B. phenologenes* dans un milieu contenant non seulement toutes les substances qui résultent de l'hydrolyse tryptique et éreptique des protéiques de la viande et de la muqueuse intestinale, mais aussi les diastases pancréatiques et intestinales, ainsi que des albumines coagulables par la chaleur. Dans ces conditions, j'ai constaté que, toutes choses égales d'ailleurs, la

quantité de phénol formée était encore les 40 centièmes de celle que le *B. phenologenes* produit dans un milieu ne contenant que de la tyrosine comme aliment organique. D'autre part, j'ai observé que si l'on ensemence ce milieu peptoné spécial avec du *B. phenologenes* et l'un des microbes suivants : *B. coli*, *B. lactis aerogenes* et *Proteus vulgaris*, la production du phénol n'est nullement influencée.

La plupart des bactériologistes ne recherchant pas la production de phénol et n'étudiant l'action sur les hydrates de carbone qu'avec un petit nombre de corps, ce microbe a peut-être été décrit sommairement comme un « coliforme » ou un « paracoli ». Comme je n'ai trouvé aucune description détaillée qui paraisse le concerner et qu'il est le seul grand producteur de phénol actuellement connu parmi les microbes de l'intestin, je propose de le nommer *Bacillus phenologenes*.

Depuis mes premiers essais, je l'ai recherché, avec la collaboration de mon regretté collègue Dominique Bertrand (1), dans deux cents échantillons de matières fécales provenant de malades atteints de troubles intestinaux chroniques ; nous ne l'avons trouvé que sept fois. D'autre part, nous ne l'avons jamais rencontré dans les matières de 20 sujets paraissant en bonne santé, doués d'un tube digestif fonctionnant normalement et indemnes de symptômes d'auto-intoxication. Les sept malades présentaient des signes de colite muqueuse, avec selles molles, mais sans véritable diarrhée ; ils accusaient, au contraire, du spasme du gros intestin, avec rétention plus ou moins marquée. L'un d'eux était manifestement un auto-intoxiqué.

Ce microbe semble donc appartenir à la flore intestinale pathologique, mais il serait imprudent de se faire une opinion définitive sur ce point avant d'avoir examiné les matières fécales d'un très grand nombre de personnes bien portantes.

Quoi qu'il en soit, il est maintenant hors de doute que, parmi les espèces microbiennes constituant notre flore intesti-

(1) Le Dr Dominique Bertrand, préparateur à l'Institut Pasteur, est mort au champ d'honneur, à Etrépilly (Bataille de la Marne), le 7 septembre 1914. Il devait publier, à l'occasion du Jubilé de E. Metchnikoff, une étude sur des microbes grands producteurs d'indol, isolés avec la même technique que le *B. phenologenes*, mais, bien entendu, à l'aide de milieux électifs au tryptophane.

nale, il y en a parfois qui sont capables de produire, aux dépens de la tyrosine, une quantité de phénol beaucoup plus grande qu'on ne le croyait généralement.

Ce n'est d'ailleurs pas seulement au point de vue quantitatif que j'ai étudié l'action du *B. phenologenes* sur la tyrosine et je me suis efforcé d'établir la nature du phénol formé. *A priori*, je croyais trouver dans mes cultures plutôt du paracrésol que du phénol, particulièrement dans les cultures semi-anaérobies, mais quelles qu'aient été les conditions de mes expériences, je n'ai jamais pu constater la présence du *p*-crésol, au moins en quantités décelables par les moyens que j'ai employés.

J'ai d'abord examiné 10 litres d'une culture obtenue avec le milieu d'isolement dont j'ai donné plus haut la composition. Ce milieu était réparti par portion de 750 cent. cubes dans 12 fioles à fond plat de 1 litre; après ensemencement, le séjour à l'étuve à 37° a été prolongé 2 semaines.

J'ai distillé les 10 litres de culture dans un appareil établi de manière à entraîner le phénol par un courant de vapeur d'eau surchauffée. J'ai conduit l'opération le plus rapidement possible et j'ai arrêté la distillation lorsque le liquide qui s'écoulait du récipient ne m'a plus donné aucune coloration avec le réactif de Millon. Après avoir *très légèrement alcalinisé* ce liquide par NaOH je l'ai distillé pour chasser l'ammoniaque, puis sursaturé par CO^2 après refroidissement. Je l'ai alors épuisé par petites portions, dans une boule à décantation de 2 litres, avec de l'éther convenablement purifié (1). J'ai alors agité la solution éthérée avec 100 cent. cubes d'une solution aqueuse de soude à 5 p. 100, rejeté l'éther après séparation des deux couches, acidifié par SO^4H^2 la solution alcaline de phénol et épuisé celle-ci par 200 cent. cubes d'éther purifié employé par portions de 40 cent. cubes.

J'ai distillé cette solution éthérée sous pression réduite et à la plus basse température possible ; c'est avec le résidu de cette distillation, tel quel ou séché dans le vide, que j'ai effectué les réactions différentielles du phénol et du paracrésol.

Avec le perchlorure de fer, en l'absence d'alcool et d'acides, j'ai obtenu une coloration violette; avec le ferricyanure de

(1) Par lavage avec le tiers de son volume d'une solution de soude à 5 p. 100, puis à plusieurs reprises avec de l'eau distillée.

potassium et l'ammoniaque, une coloration rougeâtre fonçant rapidement. L'acide molybdique, en présence d'un grand excès d'acide sulfurique (réactif de Fröhde), m'a fourni une coloration vert foncé. Avec l'aldéhyde formique et l'acide sulfurique, en présence d'alcool, j'ai obtenu un précipité rouge violacé. L'aniline, avec l'hypochlorite de sodium et la soude caustique, m'a donné une fort belle coloration bleue ; enfin le chloroforme et la potasse ont déterminé, à chaud, l'apparition d'une coloration rouge violacé.

Pour toutes ces réactions, au lieu d'utiliser comme témoin du phénol tel quel, j'ai préféré répéter, sur une solution aqueuse de phénol pur à 5 p. 1.000, toutes les opérations d'extraction que j'avais effectuées avec les cultures, et c'est également sur le résidu de la dernière distillation de la solution éthérée que j'ai fait agir les réactifs. Tous m'ont donné des colorations identiques, à l'intensité près, à celles que je viens de décrire.

Toutefois, je ne me suis pas contenté de comparer, avec le phénol, le produit provenant de mes cultures et, toujours dans les mêmes conditions, j'ai préparé un témoin avec du para-crésol pur. Ce témoin m'a donné, avec le perchlorure de fer, une coloration bleue ; avec le ferricyanure un précipité blanc ; avec l'acide molybdique, une coloration bleu foncé, légèrement teintée de violet ; avec le formol, un précipité gris verdâtre et, à chaud, une coloration verte très nette ; avec l'aniline, aucune réaction colorée, de même qu'avec le chloroforme et la potasse.

En présence de ces résultats, j'ai examiné des cultures de *B. phenologenes* obtenues avec le même milieu, non plus à l'air libre, dans des fioles simplement bouchées au coton, mais dans des ballons à fond rond scellés, après y avoir fait le vide avec la trompe à eau. En effectuant l'analyse exactement comme je l'ai exposé plus haut, j'ai fait identiquement les mêmes constatations ; pour aucune réaction je n'ai pu observer la moindre différence entre les observations fournies par les deux séries d'essais et le témoin préparé avec du phénol pur.

Je puis donc affimer que, même en milieu peu aéré, le *B. phenologenes* donne du phénol, en attaquant la tyrosine, et que, s'il produit du para-crésol, ce ne peut être qu'en très petite quantité, trop faible pour être décelée dans les conditions où

j'ai opéré. Pour élucider ce point, il sera nécessaire d'expérimenter avec de grands volumes de cultures en milieu tyrosiné, et d'essayer de caractériser le para-crésol à l'état de paracrésol sulfonate de baryum (1).

En dehors de la présence du phénol, les cultures du *B. phenologenes* possèdent un caractère sur lequel il est utile d'insister, non seulement à cause de son intérêt biochimique, mais aussi en raison de son importance pour la différenciation des espèces. Il consiste dans l'apparition plus ou moins rapide d'une coloration rose, fonçant peu à peu vers le rouge groseille, analogue à celle que présente le phénol pur exposé depuis assez longtemps à l'air. *Ce phénomène est particulièrement net et précoce, avec les cultures en surface obtenues sur le milieu préparé en solidifiant, par la gélose, le liquide nutritif employé pour l'isolement* (2); *par contre, il ne se produit pas dans les cultures anaérobies.* Je n'ai pas encore pu isoler la substance colorante en quantité assez grande pour l'analyser, mais il est vraisemblable qu'elle n'est autre que la phénoquinone, car elle possède le même spectre d'absorption que les solutions diluées de ce composé ou de vieux échantillons de phénol pur teintés de rose.

Au début de mes recherches, je pensais que cette coloration rouge était peut-être due à l'action d'une tyrosinase sur la tyrosine, aussi ai-je essayé d'extraire cette oxydase des cultures ou des corps microbiens. J'ai obtenu des extraits glycérinés et aqueux riches en diastases diverses, mais aucun d'eux ne possédait d'action sur les solutions de tyrosine. Comme à ce moment je ne disposais que d'une très petite quantité de cet

(1) Depuis que ce mémoire a été rédigé j'ai constaté que les sulfochloramines aromatiques, si employées maintenant comme antiseptiques, donnent avec les phénols, certains corps à fonctions phénoliques et de nombreux composés cycliques ou hétérocycliques, des réactions très caractéristiques. C'est ainsi que, notamment, la *p*-toluènesodiumsulfochloramine produit, en solution aqueuse, une coloration verte intense avec le phénol et les crésols ortho et méta, tandis qu'avec le paracrésol elle ne fait apparaître qu'une légère teinte jaune madère clair (topaze). Elle fait preuve également d'une grande sensibilité pour la recherche et la distinction des polyphénols; son mode d'action sur certains aldéhydes présente aussi quelque intérêt au point de vue analytique. Je compte d'ailleurs préciser dans une autre publication le mode d'emploi et les applications de ce réactif, ainsi que de quelques autres du même groupe.

(2) La coloration rose envahit peu à peu l'épaisseur de la gélose tyrosinée.

acide aminé, j'ai interrompu ces essais; il me semble maintenant qu'il n'y aurait pas grand intérêt à les reprendre, puisque la matière colorante présente les caractères spectroscopiques de la phénoquinone, produit d'oxydation du phénol.

D'ailleurs, ce ne sont point les particularités de cet ordre qui doivent retenir l'attention dans l'étude du *B. phenologenes*; il faut surtout examiner tout ce qui se rapporte à sa propriété de produire du phénol en quantités relativement grandes, afin de se faire une idée de l'importance réelle du rôle qu'elle joue dans l'auto-intoxication intestinale et d'être en mesure de répondre aux objections des auteurs qui ne croient point à l'influence néfaste des microbes de notre tube digestif.

J'ai tout d'abord recherché si l'intensité du pouvoir phénologène ne diminuait pas à mesure que se multipliaient les passages sur gélose ordinaire. J'ai constaté que, reporté sur milieu ne renfermant que de la tyrosine comme aliment organique, le *B. phenologenes* produisait encore du phénol deux ans après son isolement; la quantité de ce corps formé par litre de milieu était un peu plus faible que dans les cultures obtenues au début, mais jamais elle ne s'est abaissée au-dessous de 500 milligrammes. Quelques passages en milieu d'isolement ramenaient d'ailleurs, très vite, le pouvoir phénologène à ce qu'il avait été, mais, même après vingt réensemencements dans ce liquide nutritif, je n'ai jamais observé une proportion de phénol supérieure à 821 milligrammes par litre, chiffre un peu plus élevé, cependant, que celui de ma première détermination. A 37°, la teneur en phénol des cultures en milieu tyrosiné atteignait son maximum vers le douzième jour; après le quinzième, on pouvait observer, dans les cultures bien aérées, une très légère diminution du phénol, en même temps qu'une intensification assez nette de la coloration rouge. Toute concentration des milieux ayant été évitée, il est bien probable que le phénol disparu avait été transformé en phénoquinone par oxydation.

La persistance du pouvoir phénologène étant établie, j'ai étudié les variations que font subir à celui-ci les changements apportés à la composition du milieu. Pour ces expériences, afin de me rapprocher autant que possible des conditions qui se

trouvent réalisées dans l'intestin, je n'ai pas employé une peptone quelconque, mais bien le produit de la digestion d'un mélange, à parties égales, de pancréas de porc, de viande maigre de bœuf et de muqueuse intestinale de porc. La peptonisation de ces tissus frais, finement hachés, a été conduite rapidement et poussée seulement jusqu'à dissolution des éléments peptonisables; la liqueur, filtrée simplement sur une toile fine, a été évaporée jusqu'à siccité, dans le vide, à 45°. Grâce à M. P. Macquaire, qui très aimablement a bien voulu, sur mes indications, réaliser cette préparation, j'ai disposé d'une peptone dont les solutions étaient protéolytiques, précipitaient par la chaleur, et contenaient une forte proportion de tyrosine, décelable par la tyrosinase. Les solutions dont je me suis servi contenaient 25 grammes de cette peptone par litre; elles étaient alcalinisées très faiblement, et stérilisées par filtration sur bougie de porcelaine.

Pour déterminer l'influence du milieu sur la fonction phénologène, en même temps et avec la même culture de *B. phenologenes*, j'ai ensemencé le même volume de chacun des milieux suivants :

1° Milieu d'isolement (tyrosine + sels) ;

2° Eau peptonée;

3° Eau peptonée + 2 p. 1.000 de tyrosine ;

4° Eau peptonée + 2 p. 1.000 de tyrosine + 10 p. 1.000 de glucose ;

5° Eau peptonée + 2 p. 1.000 de tyrosine + 10 p. 1.000 de glucose + CO^3Ca en excès.

Après une semaine de séjour dans l'étuve à 37°, j'ai dosé le phénol dans les cinq cultures, en opérant exactement dans les mêmes conditions et sur le même volume. Si, pour simplifier, j'exprime par 1 la quantité de phénol trouvée dans la culture sur milieu d'isolement, les résultats obtenus peuvent se résumer comme suit :

	PHÉNOL
I. — Milieu d'isolement	1
II. — Eau peptonée	0,35
III. — Eau peptonée + tyrosine libre en excès	0,40
IV. — Eau peptonée + tyrosine + glucose	0,00
V. — Eau peptonée + tyrosine + glucose + CO^3Ca	0,003

De ces chiffres il résulte que si le *B. phenologenes* produit la

plus grande quantité de phénol lorsqu'il ne dispose que de tyrosine comme source de carbone et d'azote, il n'en est pas moins vrai qu'il manifeste encore très activement son pouvoir phénologène, en présence des produits de la digestion pancréatique de la viande et de quelques substances existant dans le contenu intestinal (1). Bien que la différence entre les essais II et III soit très faible, il est vraisemblable qu'il préfère la tyrosine libre à celle qui lui est fournie par la peptone, où elle se trouve partiellement sous forme de peptides. Par contre, il est incontestable qu'en présence de glucose, il suit la règle commune aux microbes producteurs de phénol ; en effet, il ne donne pas trace de ce composé, à moins qu'un grand excès de carbonate de calcium ne vienne combattre l'influence nuisible de la légère acidité développée par l'attaque du sucre. L'influence de ce neutralisant est d'ailleurs médiocre, puisque la teneur en phénol de la culture V est seulement les 3/1.000 de celle de la culture I.

L'addition de 1 p. 100 de bile au milieu peptoné III est sans influence sur la production de phénol; de même, celle-ci n'est pas modifiée, quand on ensemence le milieu avec du *B. coli*, du *B. aminophilus* ou du *Proteus vulgaris*, douze ou quinze heures après l'ensemencement par le *B. phenologenes*.

En somme, même dans de médiocres conditions de milieu, le *B. phenologenes* produit des quantités de phénol infiniment supérieures à celles que donnent les microbes étudiés jusqu'ici. Les bactériologistes allemands se sont donc trompés en affirmant, à maintes reprises, que la production de phénol dans les cultures pures serait toujours très faible. Les biochimistes

(1) Cette peptone est particulièrement recommandable pour l'isolement et l'étude des espèces de la flore intestinale. En ajoutant aseptiquement à de la gélose à 30 p. 1.000 (préparée à l'eau) des solutions concentrées de peptone convenablement alcalinisées, stérilisées par filtration et additionnées ou non de sucres et de AzO^3K, il est facile de préparer tous les milieux solides nécessaires. Dans des applications diverses, ils m'ont donné des résultats très intéressants; j'aurai l'occasion d'y revenir, en insistant également sur l'influence de cette peptone protéolytique sur la production de toxines et d'enzymes par certains microbes. Des peptones analogues, préparées à basse température, avec des organes ou des substances choisis d'après les affinités d'un microbe pathogène donné, permettent d'obtenir des milieux dont l'essai est tout indiqué pour l'isolement de ce germe, l'étude de sa virulence ou de ses toxines. (Consulter à ce sujet : A. Berthelot, Application d'une peptone protéolytique de viande et de muqueuse intestinale à la préparation des milieux de culture. *C. R. Soc. de Biol.*, 17 mars 1917.)

d'Allemagne, et non les moindres, ont commis une aussi lourde erreur en niant la possibilité de bien étudier la destruction microbienne des acides aminés autrement qu'avec des cultures mixtes. Dans les études de ce genre, fort belles d'ailleurs par leurs résultats purement chimiques, ils sont restés fidèles au fragment de pancréas ou de thymus pourri qui semblait être pour eux la seule source possible de microbes acidaminolytiques. Ils n'ont abandonné ce mode d'ensemencement que le jour où j'ai publié mon premier travail sur l'isolement, à l'aide de milieux électifs, des microbes qui attaquent spécialement les aminoïques. A partir de ce moment, sans jamais me citer dans leurs travaux, ils ont adopté les cultures pures et il est à croire qu'elles leur ont donné des résultats supérieurs au morceau de pancréas putréfié, car ils les ont introduites dans la préparation industrielle de certaines amines utilisées en thérapeutique.

J'aurai, d'ailleurs, l'occasion de revenir sur ces faits; je ne les ai signalés ici que pour mieux souligner l'intérêt qu'il y a, lorsqu'on veut étudier la production d'une substance toxique par les bactéries de l'intestin, à essayer, avec la méthode que j'ai indiquée, d'isoler des espèces possédant, au maximum, la propriété biochimique envisagée. Dans le cas particulier des microbes producteurs de phénol, on voit que les nombreux auteurs qui les ont étudiés depuis vingt-cinq ans n'ont pu découvrir d'espèce vraiment active, tandis que très vite, avec les milieux électifs, j'en ai isolé une qui, même en eau peptonée, donne plus de 250 milligrammes de phénol par litre. Bien entendu, à l'aide des méthodes d'étude ordinaires, on peut trouver, dans la flore intestinale, des bactéries douées d'une puissante action acidaminolytique, mais ce n'est que par hasard, alors que l'on a presque la certitude d'arriver au résultat cherché, quand on travaille avec une technique mettant à profit nos connaissances actuelles sur la dislocation microbienne des molécules aminoïques.

La notion de l'existence d'espèces microbiennes fortement phénologènes étant bien établie, je vais maintenant exposer quelques expériences que les remarquables propriétés du *B. phenologenes* m'ont donné l'idée d'entreprendre.

Depuis longtemps, Péré et Vincent ont montré que le *B. coli*,

faible producteur de phénol, est très résistant à l'action de ce composé ; de par ses propriétés mêmes, le *B. phenologenes* devait présenter cette particularité, sans doute à un bien plus haut degré. J'ai donc déterminé la dose de phénol pur qui est nécessaire pour empêcher le développement de ce microbe dans 1 litre de bouillon Martin et j'ai trouvé qu'elle était, en effet, de 6,81. J'ai observé, en outre, que du bouillon contenant 6,5 p. 1.000 de phénol, permettait encore d'obtenir de maigres cultures. Cette forte résistance à l'acide phénique n'est guère surprenante chez un microbe qui continue à manifester ses propriétés phénologènes après deux semaines de séjour dans des milieux pauvres contenant déjà plus de 500 milligrammes de cette substance par litre ; il me semble même probable qu'on pourrait l'augmenter encore, dans une certaine mesure, en accoutumant progressivement le microbe à des teneurs en phénol de plus en plus grandes. Quoi qu'il en soit, ce caractère du *B. phenologenes* possède un certain intérêt pratique, car il montre que, dans l'analyse bactériologique des eaux par le procédé de Péré ou ses dérivés, on peut éventuellement isoler, à côté du *B. coli*, certains microbes qui sont d'énergiques producteurs de phénol ; la dose habituelle de 0 gr. 85 d'acide phénique pour 1.000, même à 41°, ne gêne en rien le *B. phenologenes*. Il n'y a d'ailleurs pas grand inconvénient à ce qu'il soit confondu avec le *B. coli* lorsqu'on examine une eau au point de vue microbiologique, car il a, comme celui-ci, la même origine intestinale. Toutefois, il est bon de remarquer que ce germe étant infiniment moins répandu que le *B. coli*, sa présence dans une eau témoignerait encore plus nettement d'une souillure fécale. Sa caractérisation ne présente aucune difficulté puisqu'il suffit de 2 ou 3 passages en milieu d'isolement tyrosiné et d'une séparation des colonies sur ce même milieu gélosé pour l'obtenir en culture pure. *La seule précaution à prendre consiste à n'ensemencer qu'avec la plus petite quantité possible les tubes de milieu électif et à n'employer qu'une tyrosine parfaitement pure* (1).

(1) J'ai eu entre les mains des échantillons de tyrosine commerciale qui contenaient : les uns, de la peptone ; les autres, de la leucine et de la cystine : ils étaient, par conséquent, inutilisables pour la préparation des milieux que je préconise. J'ai dû également rejeter une tyrosine exempte d'impuretés organiques, mais contenant des traces de baryum qui empêchaient totalement le développement du *B. phenologenes*.

Lorsqu'on n'est pas pressé, la détermination chimique du phénol peut, à la rigueur, être évitée; en effet, les cultures en surface sur gélose d'isolement prennent une teinte rose très nette en quelques jours et l'on perçoit assez bien l'odeur d'eau phéniquée en sentant, au moment où on les sort de l'étuve à 37°, les cultures de dix jours obtenues avec la solution de tyrosine (1). La constatation de ces deux caractères organoleptiques, s'ajoutant à celle de la résistance au phénol établie par le mode même d'isolement, suffirait amplement à caractériser le *B. phenologenes* dans la pratique courante des laboratoires d'hygiène ; cependant, il vaudrait toujours mieux distiller les cultures et doser le phénol, ne serait-ce que colorimétriquement avec le réactif de Millon, pour essayer de trouver des microbes encore plus actifs au point de vue de la production du phénol. Du reste, il me semble peu probable qu'on en découvre donnant un rendement meilleur que le *B. phenologenes*. Le poids moléculaire de la tyrosine étant 181, celui du phénol 94, les cultures réalisées en présence de 2 p. 1.000 d'aminoïque fournissent donc environ 80 p. 100 de la quantité de phénol qui pourrait théoriquement résulter de la dislocation de la tyrosine. A cause de la très faible solubilité de celle-ci, et sans doute aussi d'une légère action retardatrice du phénol formé, ce rendement ne s'améliore pas quand on augmente dans les cultures la proportion de tyrosine non dissoute ; en outre, j'ai remarqué qu'il ne s'élève pas non plus dans les cultures en milieux renfermant moins de 1 p. 1.000 de tyrosine totale, probablement parce que leur teneur en aliment organique est insuffisante.

*
* *

Telle que je viens de l'exposer, l'étude du *B. phenologenes* est certainement bien incomplète et de nombreux points très intéressants restent à élucider ; malheureusement, il me sera

(1) Pour bien percevoir l'odeur de phénol, il faut verser 30 à 50 cent. cubes de culture encore chaude dans un vase largement ouvert et ne pas se contenter de sentir une culture contenue dans un tube à essai muni de son bouchon d'ouate.

impossible d'entreprendre les recherches nécessaires tant que je n'aurai pas isolé à nouveau ce microbe. La culture type et les 7 échantillons que j'avais identifiés avec mon regretté collaborateur et ami, Dominique Bertrand, ont été perdus faute d'avoir été réensemencés depuis que la mobilisation m'a éloigné de mon laboratoire. Dès que j'aurai la chance de retrouver un *B. phenologenes* possédant une activité biochimique aussi grande que celle de la première race, je compléterai l'étude de cette intéressante espèce en m'efforçant tout d'abord de déterminer la nature des substances formées, en même temps que le phénol, dans les cultures où la tyrosine est la seule substance organique, puis celle des composés qui prennent naissance dans les solutions nutritives glucosées.

Que ce soit avec le *B. phenologenes* ou avec une espèce analogue isolée par la même méthode, des problèmes fort importants pourront être abordés, qu'on était forcé, jusqu'ici, de laisser de côté parce que l'on ne connaissait point de microbe capable de produire autant de phénol aux dépens de la tyrosine. Il sera possible, notamment, d'établir l'influence de la surinfection du tube digestif par une bactérie très phénologène, voire même d'étudier, par des expériences de très longue durée, l'action nocive d'une production exagérée de phénol dans l'intestin.

On pourra également essayer d'augmenter par l'accoutumance la résistance au phénol du *B. phenologenes*, d'obtenir une race attaquant encore plus énergiquement la tyrosine, de préparer un peu de phénol entièrement par voie microbienne en soumettant une albumine très riche en tyrosine à l'action successive d'une bactérie protéolytique et du *B. phenologenes*.

Il sera aussi très intéressant d'examiner la résistance des microbes phénologènes aux antiseptiques dérivés du phénol ou de constitution analogue, de même que leur action sur des composés voisins de la tyrosine ou d'autres acides aminés, surtout cycliques et hétérocycliques. Dans un autre ordre d'idées, il sera non moins important d'étudier l'action sur la tyrosine de grandes masses des corps microbiens du *B. phenologenes*, obtenues par le procédé de M. Nicolle, et, mieux encore, celle d'extraits diastasiques du même bacille, préparés soit par auto-

lyse aseptique, soit à l'aide du saccharose, de la glycérine ou du phosphate disodique (1).

Mais, quel que puisse être l'intérêt de telles études, les faits que je viens de relater suffisent amplement, et j'en suis heureux, pour montrer combien M. Metchnikoff avait raison de prévoir que l'on trouverait dans notre tube digestif de nouveaux microbes producteurs de phénol (2). Il se trouve même que le premier de ceux-ci possède un pouvoir phénologène dix fois plus grand (3) que celui des plus puissants générateurs de phénol connus et que, par conséquent, sa découverte constitue un nouvel argument à opposer aux auteurs qui nient l'importance de l'auto-intoxication intestinale (4).

(1) En 1913, alors que j'étudiais encore le *Proteus*, j'ai observé qu'on peut obtenir des extraits très actifs en traitant les corps microbiens (proc. M. Nicolle) par le sucre finement pulvérisé (1 partie microbes + 2 parties sucre) ou en reprenant par l'eau la poudre obtenue dans la déshydratation des microbes par PO^4Na^2H. Je publierai, d'autre part, les détails de la technique qui m'a donné, pour certaines diastases et certaines endotoxines, des résultats bien supérieurs à ceux que fournissent les procédés usuels. Avec mon regretté collègue D. Bertrand, j'ai même constaté que, d'une manière générale, ces extraits, surtout ceux résultant du traitement par PO^4Na^2H, constituent d'excellents vaccins préventifs ou curatifs. Les extraits obtenus avec le sucre sont particulièrement commodes pour les essais d'immunisation par voie digestive.

(2) Elie Metchnikoff, Poisons intestinaux et scléroses. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIV, octobre 1910, p. 757.

(3) Je ne tiens compte ici que des quantités dosées dans les milieux peptonés usuels, car les auteurs qui m'ont précédé ne semblent pas avoir fait de cultures en solution de tyrosine. Avec le rendement donné par celle-ci, le pouvoir phénologène du *B. phenologenes* serait quarante fois plus grand que celui des espèces déjà connues.

(4) Une analyse sommaire de ma note préliminaire sur le *B. phenologenes* (*Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 164, 22 janvier, p. 196) me fait dire que l'isolement d'un microbe grand producteur de *phénol* « est une preuve en faveur de la théorie de Metchnikoff sur l'action sclérosante des petites quantités de phénol et de *p.* crésol engendrés par la putréfaction intestinale ». (*Bull. de l'Inst. Pasteur*, t. XV, 1917, p. 261). Cette action sclérosante a été établie par les travaux mêmes de M. Metchnikoff et, comme aujourd'hui, j'avais simplement écrit que l'isolement du *B. phenologenes* était une nouvelle preuve de la justesse des prévisions de M. Metchnikoff qui, dès 1910, pensait qu'on trouverait de puissants producteurs de poisons parmi les microbes de notre tube digestif.

L'IMMUNITÉ DANS LA SYMBIOSE

par J. MAGROU.

(Avec la planche I.)

Dans l'étude de la vie en commun des êtres supérieurs avec les micro-organismes capables de les envahir, il est classique de distinguer deux cas, selon que la présence du microbe est nuisible à l'hôte qui l'héberge, ou qu'elle lui est avantageuse. On s'accorde à appeler « maladies parasitaires » les associations qui répondent au premier type, et à leur opposer les secondes, sous le nom de « symbioses ».

En fait, une telle distinction a été souvent faite *a priori*, et elle répond moins à la nature des choses qu'à la diversité des tendances qui ont guidé les recherches dans ces domaines. Les pathologistes qui ont étudié le parasitisme ont eu pour préoccupation essentielle de préciser les moyens d'attaque et de défense mis en œuvre par des organismes antagonistes. Au contraire, la question de la symbiose a été communément abordée avec le souci de déterminer l'utilité des micro-organismes pour les hôtes auxquels ils s'associent. On conçoit par là que le problème de l'immunité, qui a dominé de bonne heure l'étude des maladies infectieuses, ne se soit pas de longtemps posé à propos de la symbiose.

Le sujet a été envisagé, du point de vue le plus large, par Noël Bernard, qui a compris que la maladie et la symbiose n'étaient que deux aspects différents d'un même phénomène, et que l'une et l'autre étaient soumises aux lois générales communes de la pathologie. L'auteur de l'*Évolution dans la symbiose* a montré clairement que, dans les cas même où l'association entre deux organismes commensaux offre l'apparence de la plus parfaite harmonie, les actions réciproques des deux hôtes en présence ne diffèrent par rien d'essentiel de celles qui s'exercent entre un animal supérieur et une bactérie pathogène

qui tente de l'envahir. A la lumière de ces découvertes, la symbiose n'apparaît plus que comme un mode particulier de maladie infectieuse, et son étude devient un terrain de choix pour la compréhension des lois de l'immunité.

Les recherches expérimentales de Noël Bernard ont porté sur les Orchidées, plantes qui hébergent normalement, dans leurs racines, des champignons endophytes. L'expérience montre que la symbiose s'établit nécessairement, chez ces plantes, dès le début de la vie, la germination de leurs graines ne pouvant se faire que si les embryons sont, au préalable, envahis par les champignons [**1**]. Si l'on expose des graines d'Orchidées à l'action des endophytes, la plupart d'entre elles sont rapidement pénétrées par le mycélium. Mais, après ce stade uniforme de pénétration, on observe des phénomènes variés, suivant les conditions de l'expérience [**2**, **3**]. Tantôt, les embryons se laissent envahir en totalité et détruire par les champignons, auxquels ils n'opposent aucune réaction défensive. Tantôt, au contraire, ils détruisent leurs envahisseurs, grâce à un mécanisme de digestion intracellulaire, exactement comparable à la phagocytose. Tantôt enfin, ils tolèrent la présence de leurs hôtes, et contractent la symbiose avec eux ; dans ce dernier cas, la phagocytose s'exerce encore, mais de façon partielle et tardive; elle ne suffit plus à enrayer la marche des champignons, et la protection des tissus essentiels de la plante est assurée par l'intervention de « propriétés humorales », semblables à celles qui s'exercent chez les animaux, dans l'immunité acquise.

L'examen critique de nombreux documents se rapportant à la symbiose chez les plantes supérieures a permis à Noël Bernard de généraliser les lois qu'il avait découvertes chez les Orchidées. Il existe, en effet, un nombre immense de plantes qui vivent en symbiose avec des champignons localisés dans leurs racines. L'étude de ces « plantes à mycorhizes » a fait l'objet d'importantes recherches histologiques. Mais ces recherches ont généralement porté sur des individus parvenus à l'état adulte, et si elles sont suggestives par le grand nombre et la diversité des espèces chez lesquelles elles ont été poursuivies, elles offrent, en revanche, peu de ressources pour comprendre les origines de la symbiose, son évolution et son

retentissement sur le développement des êtres qui s'y trouvent soumis.

J'ai tenté, dans un cas de symbiose observé chez la Pomme de terre, d'analyser le mécanisme de l'immunité, en appliquant la méthode évolutionniste qui avait guidé Noël BERNARD dans ses recherches.

* * *

On sait qu'en règle générale les plantes à tubercules ou à rhizome hébergent des champignons de mycorhizes. La Pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum*) paraît faire exception à cette loi ; ses racines sont, en effet, régulièrement indemnes d'infestation. Mais tout porte à croire qu'il s'agit là d'une exception accidentelle, liée aux conditions particulières de vie que la mise en culture a imposées, dans ce cas, à la plante. La présence de mycorhizes chez les espèces vivaces sauvages du genre *Solanum* paraît être un fait très général : JANSE [**9**] les a observées chez le *Solanum verbascifolium* des forêts vierges de Java. Noël BERNARD [**6**] les a décrites chez nos Douces-Amères indigènes (*Solanum Dulcamara*). Avec Mme Noël BERNARD [**7**], nous les avons retrouvées chez le *Solanum Maglia* du Chili, plante sauvage à tubercules, très voisine du *Solanum tuberosum* cultivé. Ce dernier fait confirme une hypothèse formulée par Noël BERNARD [**4**], d'après laquelle la Pomme de terre descendrait d'ancêtres sauvages régulièrement infestés, qui se seraient affranchis de la symbiose à la suite de leur domestication.

Il est facile, d'ailleurs, « d'inoculer » à la Pomme de terre le champignon qui vivait en symbiose avec ses ancêtres sauvages. Il suffit, pour cela, de semer des graines de *Solanum tuberosum* dans un sol où ont végété des Douces-Amères infestées [**10, 11**]. Dans ces conditions, les racines des jeunes Pommes de terre sont rapidement pénétrées par les champignons ; mais, par la suite, le sort de l'association ainsi ébauchée diffère suivant le cas.

Certaines plantes détruisent leurs envahisseurs par une réaction précoce et énergique, et restent ensuite indemnes d'infestation. Les autres, au contraire, tolèrent leurs hôtes, et contractent avec eux une symbiose durable. Grâce à cette circonstance, la culture ainsi conduite prend la valeur d'une

expérience comparative, où les plantes douées d'une immunité précoce représentent des « témoins » soustraits à l'action des parasites. Il suffit de comparer ces témoins indemnes aux pieds infestés pour apprécier l'influence de la symbiose sur le développement; une telle comparaison conduit à constater que les plantes qui détruisent les champignons dès leur pénétration sont, par la suite, régulièrement dépourvues de tubercules: leurs rameaux secondaires évoluent en tiges aériennes feuillées ou en longs stolons souterrains, non tubérisés. Au contraire, les plantes qui réalisent la symbiose produisent toujours des tubercules, développés à l'extrémité des courts stolons souterrains qui représentent les ramifications de la tige principale. On sait de même que, chez les Orchidées, la symbiose a pour conséquence la formation de tubercules [**2**]; mais, comme elle s'établit ici très précocement, les tubercules apparaissent dès la germination. Les graines de Pommes de terre, au contraire des graines d'Orchidées, peuvent germer sans le concours de champignons, dans des conditions d'asepsie rigoureuse; la symbiose s'établit, dans ce cas, à un stade plus tardif de l'évolution, et l'on conçoit que la tubérisation qui en est la conséquence, soit de même plus tardive que chez les Orchidées.

Il existe donc un étroit parallélisme entre le cas de la Pomme de terre et celui des Orchidées. L'étude de l'évolution intracellulaire de l'endophyte des *Solanum* le fera paraître plus clairement encore.

*
* *

L'infestation des Pommes de terre par leurs champignons endophytes s'effectue dans les stades qui suivent la germination, au moment où les plantules déploient leurs cotylédons, et accroissent et ramifient leurs racines. La résistance des parois cellulaires oppose à la pénétration du mycélium un premier obstacle, qui réalise une immunité en quelque sorte mécanique. Cette protection mécanique suffit à mettre les racines à l'abri de l'invasion de la plupart des micro-organismes qui pullulent dans le sol, mais elle est sans effet durable contre les attaques de l'endophyte spécifique.

Le champignon aborde les jeunes racines dans leurs portions déjà accrues et différenciées, au niveau de la zone des poils

absorbants. La paroi cellulosique mince de l'assise pilifère est traversée sans difficulté, mais l'assise subéreuse sous-jacente oppose une résistance plus sérieuse, que le champignon arrive à vaincre par le même processus très singulier que Noël Bernard avait déjà décrit chez la Douce-Amère.

Parvenu dans l'assise pilifère, le mycélium y forme, en effet, des dilatations vésiculeuses à parois épaisses, dont la face profonde se découpe par des incisures en digitations, qui viennent au contact de l'assise subéreuse et s'appliquent contre sa paroi, en formant des disques adhésifs (planche I, fig. 1, d_1). Le centre du disque adhésif émet ensuite un bourgeon en forme de coin, qui invagine la paroi subérifiée, la digère, et finalement la perfore d'un orifice par où le mycélium peut s'engager dans l'assise subéreuse (fig. 1, d_2, d_3, d_4).

Arrivés là, les filaments mycéliens reprennent leur calibre normal et traversent les cellules en droite ligne, sans s'y attarder; ils atteignent ainsi l'assise corticale sous-jacente, dont ils envahissent les cellules. A partir de ce stade, la marche des phénomènes diffère selon que la symbiose s'établit, ou que l'endophyte succombe précocement à l'action nocive que la plante exerce sur lui. J'examinerai d'abord le sort du champignon dans la première de ces deux alternatives.

Parvenu dans les cellules sous-jacentes à l'assise subéreuse, le champignon adopte un mode de végétation très particulier, que l'on retrouve, à quelques variantes près, chez la plupart des plantes à mycorhizes. Chez la Pomme de terre, la première étape de cette évolution est marquée par le pelotonnement du mycélium. Les filaments, au lieu de croître comme précédemment en droite ligne, se pelotonnent d'une manière plus ou moins compliquée dans les cellules qu'ils envahissent (planche I, fig. 2). Les champignons progressent sous cette forme, et arrivent à former des plages infestées, vastes et nombreuses, qui occupent l'assise moyenne de l'écorce. Mais, dans tous les cas, ils demeurent strictement localisés dans cette assise; les zones plus profondes de l'écorce, et à plus forte raison le cylindre central, restent constamment indemnes d'infestation. Les noyaux des cellules infestées sont hypertrophiés et plus ou moins déformés; ils prennent parfois un aspect amœboïde (fig. 2, n).

Le mycélium qui forme les pelotons n'est pas cloisonné, ou du moins, s'il présente çà et là quelques cloisons, elles sont rares et disposées sans ordre. Les filaments sont volumineux, de calibre irrégulier; ils renferment un protoplasma réticulé et sont pourvus de nombreux noyaux (fig. 2, *n'*). Ils ne tardent pas à émettre des ramifications qui se divisent, suivant le mode dichotomique, en branches de plus en plus grêles, pour se résoudre, en définitive, en ramuscules d'une extrême ténuité. Ces fins rameaux dichotomes s'enchevêtrent d'une manière extraordinairement complexe, formant des buissons touffus qui remplissent la cavité des cellules (fig. 3). De telles formations sont caractéristiques des champignons de mycorhizes; on leur donne le nom d'arbuscules.

C'est après la différenciation des arbuscules que les champignons accusent les premiers symptômes de dégénérescence. Les extrémités des fins rameaux dichotomes se rétractent et s'agglutinent, de manière à former des masses multilobées, réfringentes et surcolorables, appendues aux ramifications du mycélium (fig. 4 *s*, *s'*). Janse [9], qui a décrit ces formations chez un grand nombre de plantes à mycorhizes, les a désignées sous le nom de sporangioles. Gallaud [8] a montré qu'elles devaient être considérées comme des résidus de la digestion des arbuscules par les cellules où ils se sont formés ; un tel processus de digestion intracellulaire, s'exerçant vis-à-vis d'un parasite, est à rapprocher de la phagocytose, qui, chez les animaux, détruit par le même mécanisme les germes qui tentent de pulluler dans l'organisme (1).

Grâce au progrès de la réaction phagocytaire, les sporangioles augmentent de volume, deviennent confluents, et finissent par former d'énormes masses de dégénérescence mamelonnées, qui prennent la place des arbuscules (fig. 5, *c*). Mais, dans les cas même où la digestion intracellulaire atteint cette phase ultime, les gros filaments mycéliens ne sont pas détruits ; ils restent bien vivants, et l'on distingue, aussi nettement qu'aux premiers

(1) On ne doit pas évidemment s'attendre à retrouver chez les cellules végétales, enfermées dans des parois rigides, la propriété de poursuivre et d'englober les micro-organismes ; mais il suffit que ces cellules soient capables de digérer les parasites qui les envahissent, pour que l'on puisse parler de phagocytose, sans s'écarter du sens étymologique de ce terme.

stades de l'infestation, leur protoplasma réticulé et même leurs noyaux (fig. 5, *n'*). Comme la progression du champignon s'effectue, non par les arbuscules, mais par les gros troncs mycéliens, on conçoit qu'en dépit de la phagocytose, elle ne soit pas enrayée ; à partir d'une cellule où les arbuscules sont totalement détruits, les filaments principaux restés intacts sont capables de propager l'infestation dans les cellules voisines (fig. 5).

Il n'en est pas de même lorsque la Pomme de terre, au lieu de tolérer la symbiose, détruit précocement ses envahisseurs. Dans ce cas encore, les champignons parviennent bien à produire des pelotons dans les cellules de l'assise moyenne de l'écorce, mais ces pelotons, à peine constitués, subissent une digestion intracellulaire totale ; les gros troncs mycéliens qui les forment apparaissent rétractés, surcolorables, vidés de leur contenu protoplasmique (fig. 6) ; les sporangioles manquent ou sont de petite taille, ce qui indique que les arbuscules ne se sont pas différenciés, ou du moins n'ont pas eu le temps d'atteindre leur complet développement. Après cette phagocytose énergique, la progression du champignon est définitivement enrayée, aussi les cellules envahies restent-elles peu nombreuses ; elles forment de rares plages de dimensions restreintes, que l'on ne peut déceler que par un examen minutieux de coupes en série, pratiquées dans la totalité des racines de la plante. Noël Bernard a observé de pareils cas d'immunité rapidement acquise chez des embryons d'Orchidées ; il les a mis en parallèle avec les cas d'immunité naturelle observés chez les animaux qui guérissent de maladies accidentelles bénignes, après destruction des microbes par les phagocytes [**3**].

*
* *

Il résulte de ces observations que la phagocytose, lorsqu'elle s'exerce de façon précoce et rapide, suffit à préserver la plante de l'invasion de l'endophyte. Mais, le plus souvent, l'action digestive des cellules, s'exerçant de façon tardive et partielle, respecte, comme on l'a vu, les organes qui servent à la progression du champignon ; elle est, dès lors, impuissante à enrayer sa marche, et la symbiose peut s'établir. Pourtant, dans

ce cas même, l'infestation reste étroitement localisée dans des tissus bien déterminés de la plante; les tubercules, les tiges aériennes et souterraines, le cylindre central et les couches corticales profondes de la racine, les méristèmes, ne sont jamais atteints par l'endophyte. Chez les plantes qui tolèrent leurs hôtes et se laissent largement envahir, il persiste donc bien une certaine immunité, qui a pour effet d'imposer, en définitive, des limites à la marche du champignon. La phagocytose n'étant plus en pareil cas un moyen efficace, il faut chercher une autre cause à cette immunité.

Noël Bernard l'attribue aux modes de végétation très particuliers que les champignons de mycorhizes adoptent communément dans leur vie intracellulaire, et qui ont pour effet de ralentir leur progression. Le pelotonnement empêche le mycélium de progresser suivant le plus court chemin, et le contraint de rester localisé, un temps plus ou moins long, dans chacune des cellules qu'il envahit. La formation des arbuscules retarde plus sûrement encore la marche du champignon, puisque les filaments grêles qui les constituent ne pénètrent jamais dans les cellules voisines de celles qu'ils habitent. Ralentis grâce à ce processus, les progrès de l'infestation se règlent, en quelque sorte, sur le développement de la plante, et ne peuvent s'étendre au-delà de certaines limites; la protection de la majeure partie des tissus de l'hôte se trouve, de la sorte, assurée.

Or les pelotons et les arbuscules, formations constantes chez les endophytes intracellulaires, se rencontrent, au contraire, exceptionnellement chez les champignons qui mènent une existence autonome. Il est vraisemblable qu'il s'agit là de modes de végétation anormaux, résultant d'une adaptation à la vie parasitaire, liés par conséquent à la nature physico-chimique de la sève intracellulaire des plantes, autrement dit à une propriété humorale. L'immunité dans la symbiose serait dès lors comparable à l'immunité acquise des animaux vaccinés; on sait, en effet, que, dans le mécanisme de cette immunité, les propriétés défensives des humeurs entrent en ligne de compte et acquièrent une importance prépondérante. En fait, les microbes, dans les humeurs des animaux vaccinés contre eux, adoptent des modes de végétation anormaux qui ont pour effet d'entraver leur développement. Telle est, par exemple, l'agglu-

tination des bactéries, qui se présente dans l'immunité acquise comme un épisode à peu près constant, et que l'on peut rapprocher du pelotonnement intracellulaire des champignons symbiotiques.

D'ailleurs, dans quelques cas, la réalité de l'immunité humorale a pu être mise directement en évidence : Noël Bernard [5] a montré, en effet, que le suc des tubercules d'Orchidées était capable de détruire les endophytes de ces plantes ; or la substance fungicide ainsi produite par les tubercules a une action rigoureusement spécifique ; d'autre part, elle est détruite par le chauffage à 55° ; elle a donc les caractères essentiels des anticorps qui se développent dans les humeurs des animaux immunisés. Chez la Pomme de terre, la même expérience n'a pas été tentée, mais si l'on observe que là, comme chez les Orchidées, la tubérisation est le résultat de la symbiose, on est conduit à supposer que dans un cas comme dans l'autre, les tubercules représentent des organes de défense, capables d'assurer la protection des plantes contre leurs envahisseurs.

*
* *

Les recherches de Noël Bernard sur les Orchidées et leurs Champignons commensaux ont montré qu'il n'y a pas un abîme infranchissable entre les moyens de protection des plantes et ceux des animaux contre les parasites. L'existence de processus défensifs à peu près identiques chez deux groupes d'Angiospermes aussi distants que les Orchidées et les Solanées suggère que les lois de l'immunité ont, chez les plantes comme chez les animaux, un caractère général. Quelles que soient les lacunes de nos connaissances dans ces sujets complexes, il est permis, sans dépasser la portée des faits acquis, de pressentir qu'il sera un jour possible de grouper, dans le cadre d'une théorie largement compréhensive, les phénomènes d'adaptation des micro-organismes aux hôtes capables de les héberger.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

[1] BERNARD (Noël). — Recherches expérimentales sur les Orchidées. *Revue gén. de Bot.*, XVI, 1904.

[2] ID. — L'Évolution dans la symbiose. *Ann. Sc. nat. Bot.*, 9e série. IX, 1909.

[3] ID. — Remarques sur l'immunité chez les plantes. *Bull. Institut Pasteur*, VII, 1909.

[4] ID. — L'origine de la Pomme de terre. *Bull. Soc. acad. d'Agriculture de Poitiers*, 1909.

[5] ID. — Sur la fonction fungicide des bulbes d'Ophrydées. *Ann. Sc. nat. Bot.*, 9e série, 1911, p. 223.

[6] ID. — Les mycorhizes des *Solanum*. *Ibid.*, p. 235.

[7] Mme Noël BERNARD et J. MAGROU. — Sur les mycorhizes des Pommes de terre sauvages. *Ibid.*, p. 252.

[8] GALLAUD. — Etudes sur les mycorhizes endotrophes. *Revue gén. de Bot.*, XVII, 1905.

[9] JANSE. — Les endophytes radicants de quelques plantes javanaises. *Ann. Jard. Bot. de Buitenzorg*, XIV, 1897.

[10] MAGROU (J.). — Symbiose et tubérisation chez la Pomme de terre. *C. R. Acad. des Sc.*, CLVIII, 1914.

[11] ID. — Les champignons endophytes des *Solanum*. *Bull. Soc. de Pathologie comparée*, janvier 1914.

LÉGENDE DE LA PLANCHE I

FIG. 1. — Coupe longitudinale d'une racine chez une jeune plantule de Pomme de terre, montrant la pénétration du champignon. *ap*, assise pilifère; *p*, poils absorbants; *as*, assise subéreuse. On voit dans l'assise pilifère un filament mycélien vésiculeux, avec disques adhésifs d_1, d_2, d_3, d_4, aux stades successifs de leur pénétration; *m*, peloton mycélien dans l'assise moyenne de l'écorce; *n*, noyau cellulaire.

FIG. 2. — Coupe longitudinale dans une racine de Pomme de terre, montrant un stade précoce de l'infestation. *m*, mycélium pelotonné; *n*, noyaux cellulaires; *n'*, noyaux du champignon.

Fig. 3. — Un arbuscule dans une cellule corticale d'une racine de Pomme de terre, coupée longitudinalement.

Fig. 4. — Coupe longitudinale dans une racine de Pomme de terre, montrant le début de la dégénérescence du champignon. *s*, sporangioles se formant aux dépens des rameaux d'un arbuscule; *s'*, sporangioles plus développés.

Fig. 5. — Deux cellules infestées dans une racine de Pomme de terre. On voit en *c*, dans la cellule inférieure, des corps de dégénérescence volumineux, résultant de la destruction d'un arbuscule par phagocytose. Mais les gros troncs mycéliens restés indemnes ont envahi la cellule supérieure, où ils ont produit un arbuscule *a*. *n*, noyau cellulaire; *n'*, noyaux du champignon.

Fig. 6. — Deux pelotons mycéliens phagocytés en totalité, chez une Pomme de terre douée d'immunité précoce. Remarquer l'absence de sporangioles.

La Pomme de terre dont une racine est figurée en 6 a évolué sans produire de tubercules: les racines figurées en 2, 3, 4 et 5 appartiennent à des plantes précocement et abondamment tubérisées. Il s'agit dans tous les cas de plantes issues de graines.

(Gr. = 640 pour toutes les figures.)

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

32e ANNÉE FÉVRIER 1918 N° 2

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de E. Metchnikoff.

A NOTE ON THE "GRANULE-CLUMPS" FOUND IN ORNITHODORUS MOUBATA AND THEIR RELATION TO THE SPIROCHAETES OF AFRICAN RELAPSING FEVER (TICK FEVER)

by Colonel Sir WILLIAM B. LEISHMAN

C. B., M. B., F. R. C. P., F. R. S., LL. D., K. H. P., A. M. S.

In 1908 I obtained a number of *Ornithodorus moubata* from Nyasaland and from Uganda, with a view to studying the course of events in Tick Fever in experimental animals. After several failures I eventually secured a batch of ticks which proved to be infective and by their bites produced in a monkey a typical attack of Relapsing Fever, associated with the occurrence of large numbers of *Spirochaeta duttoni* in the blood. I was then able to infect a number of ticks by allowing them to gorge themselves on this infected monkey and have, since then, been able to maintain the strain of spirochaetes, either by passage from mouse to mouse or through the bites of infected ticks. I was thus in a position to study the fate of spirochaetes ingested by the ticks, as well as such questions as the nature of the hereditary transmission of the infection in the tick, the mechanism of infection by the bite of the tick, and other points.

The results of some of this work were published in 1909 and 1910 [1].

The purpose of the present note is to record some further observations which appear to throw fresh light upon the nature of the granule-clumps, described in the above mentioned papers, which, I suggested, were probably derived from spirochaetes and were capable, under certain conditions, of once again developing into spirochaete form. To recall a few of these earlier observations; it was noted that these granules were almost constantly found in various tissues of *Ornithodorus* and that the inoculation of tissues containing such granules, but, as far as could be determined, no spirochaetes, frequently resulted in the production of spirochætosis in mice. The occurence of similar granules in the eggs of the fecundated female tick and my almost invariable failure to find spirochaetes in such eggs, even when the mother tick had been heavily infected shortly before, further suggested to me that it might be in this form that the virus passed to the next generation of ticks.

Some of my experiments have since been repeated by other workers, either with *Spirochaeta duttoni* and *Ornithodorus moubata* or with *Spirochaeta gallinarum* and *Argas persicus*, with somewhat contradictory results. Thus, Hindle [2] and Fantham [3] confirmed many of my observations and agreed with most of my conclusions, while strong confirmatory evidence was also obtained from Balfour's work on the Spirochaetosis of Sudanese fowls [4]. On the other hand, the more recent work of Marchoux et Couvy [5], of Kleine et Eckard [6], of Wittrock [7] and of Todd [8] has led these investigators to conclusions differing from mine. They have not been able to find any evidence of a connection between the granule-clumps and the spirochaetes and they are satisfied that the facts of transmission, whether direct or hereditary, are to be accounted for more simply by the persistence of the spirochaetes, as such, in the ticks and by their transmission in this form through the egg to the young tick.

I hope before long to have an opportunity of putting on record fuller details of my recent work than are possible in this note and of discussing some of the apparent discrepancies

between the results of my confrères and those of myself. I shall here only mention briefly some recent observations which have strengthened my personal conviction that some, at all events, of these disputed granule-clumps are derived from spirochaetes and are able subsequently to develope again into spirochaete form.

In my earlier work the method employed was to infect simultaneously a number of ticks of the same age by permitting them to feed on a heavily infected mouse. The ticks were then divided into two or three batches, which were kept under different conditions of temperature and moisture. Every day, or every 2 or 3 days subsequently, one of each batch of ticks was carefully dissected and a close examination was made of the different organs, tissues and fluids for the presence of spirochaetes and of granules; careful records were kept of the results and sketches made of anything of interest. The microscopical examination was in part carried out on the fresh fluids or on pieces of tissue teased out in saline solution, but chiefly by observation of dried film preparations, fixed and stained by my own modification of Romanowsky's method. In the latter case the chromatin staining was carried to a high degree of intensity, the films being finally treated with 60 p. 100 Alcohol to dissolve off all traces of deposit of the stain. I note that MM. Marchoux et Couvy are of opinion that the Chromatin method of staining may fail to colour thin or delicate spirochaetes and they recommend as a better method the use of Gentian Violet. I find however that my method demonstrates *Treponema pallidum* readily in films in which these delicate organisms are quite untouched by Gentian Violet and, further, it permits of the ready recognition of *Spirochaeta duttoni* in tissues such as muscle fibres when Gentian Violet fails to disclose them.

Subsequently to the series of observations to which my previous papers referred, the dark-ground method of illumination came into more general use and I have since repeated some of my earlier experiments, utilising this method of examination as a control and supplement to the staining method mentioned above, and I have found it of great service, particularly in the determination of motility in the spirochaetes. The

appearance of spirochaetes illuminated in this manner is naturally familiar to all workers on the subject and I shall only refer to one or two points in connection with it. In the first place, one is struck by the contrast between the high refractility and homogeneous appearance of young and vigorously motile spirochaetes and the low refractility of many of those which are motionless, distorted in shape and presumably dead. Another point which was studied with interest was the so-called « granule-shedding » phenomenon, described in connection with *Treponema pallidum* and other Spirochaetes by Balfour and O'Farrel [9]. In the case of *Spirochæta duttoni* in freshly shed blood from an infected mouse, kept under continuous observation in a thermostat, it was sometimes easy to detect highly refractile granules, apparently in the substance of the spirochaete, coursing rapidly from end to end of the rapidly rotating organism, and even to observe the sudden extrusion of one of these granules from such a spirochaete. So far, my observations were in accord with those of Balfour and O'Farrel, but I was surprised to find that, if one continued to keept he particular spirochaete and the particular granule which it had extruded under observation, as was sometimes possible, the granule apparently re-entered the body of the spirochaete and, once more, was seen to travel up and down it from end to end. I have observed this sequence of extrusion and intrusion, in the case of one spirochaete and one granule, no less than seven times in succession within 3/4 of an hour and I am inclined to think that the « granule-shedding » in this instance was an optical phenomenon and could be explained on the assumption that a grain of blood-dust or haemoconia had become involved in the vortex currents produced by the rapidly rotating spirochaete and that it was, in this manner, made to travel up and down the body of the spirochaete, accordingly as the latter rotated first in one direction and then in the opposite, as is their habit. It is of course quite possible that the granules I observed were not of the same nature as those described by Balfour and O'Farrell, but my impression is that they were the same and that the phenomenon may have a physical rather than a vital explanation.

Special attention was paid to the appearance of the granule-

clumps under dark-ground illumination. These were most readily observed in crushed portions of a Malpighian tubule or of an ovary suspended in a drop of saline solution. At first it was by no means easy to be certain of the identity of any particular group of granules seen against the dark background, but it soon became possible to recognise them by attention to certain points. In the first place, the size, number and form of the granules composing a clump were more or less uniform; secondly, the brightness and yellowish-white colour of the light refracted by the granules was more or less characteristic and, thirdly, the granules were seen to be embedded in a well defined but faintly refractile matrix, an appearance only occasionally noted in stained specimens. This last point appears to me of some significance as suggesting that there is some vital connection between the different portions of the clump, in opposition to the view that the granules are merely held in apposition by physical attraction. The appearance of the clumps is illustrated in fig. I, n°s 1-6.

In this connection I may mention a point of some technical utility which I have noted in the course of these observations, and which is apparently unknown to other workers. It is usually assumed that the use of the dark-ground method of illumination is limited to moist or fluid preparations. I find, however, that it is quite possible to examine a dried and stained film, for example, a film prepared from some organ or tissue of a tick and stained by Romanowsky, to note from this all that can be learned as to the detailed structure of some cell or parasite and then, leaving the specimen in position on the stage of the microscope, to change the illuminating system for the dark-ground method. It will be found that the resulting picture differs very slightly from that which would have been given by the same structure if it had been examined, unstained' in a fluid medium. The refractility of the different elements appears little altered and the colours produced by the staining have only a slight modifying influence on the white reflex of light refracted from the object. By this proceedure it was possible to determine the staining reaction of a particular granule or granule-clump and then to investigate its refracting power by dark-ground illumination. This method I have found

of service in the present investigation and it ought also to be useful in other directions.

In general, this later series of experiments has been confirmatory of my earlier ones but, in several instances, I have found it necessary to revise my former conclusions in the light of further experience. It would not, however, be possible, within the necessary limits of this communication, to deal satisfactorily with the whole of the work; so I shall confine myself to a few points, reserving the fuller account for another occasion.

I find that the spirochaetes, after ingestion by the tick, retain their motility for several days, the period depending chiefly on the temperature at which the ticks have been kept. Subsequently, they lose their motility and tend to agglomerate into great tangles or masses which, when stained, are seen to consist of spirochaetes whose chromatin is fragmented into deeply staining segments or granules. Such spirochætes I believe to be dead and I think it probable that the segmented chromatin may persist in the form of rods or grains and may reach the Malpighian tubules and other tissues of the tick, accounting in this way for some, perhaps for the majority of the chromatin granules found in such tissues.

Other spirochaetes, however, appear to behave in a different manner and show the curious appearance of a lateral or, more rarely, a terminal protrusion or "bud". This lateral bud was described by me in my earlier papers and has also been observed by many others, both in connection with *Spirochaeta duttoni* and other spirochaetes. I am now inclined to attribute to it an important rôle in the life of the organism, as I believe it to be the origin of the granule clump which may subsequently develope into another spirochaete. I have, for instance, observed a spirochaete which had one of these large lateral buds attached to it, in active rotatory movement for a period of half an hour; the bud contained 3 or 4 highly refractile granules and there could be no possible doubt that the structure was attached to and part of the living organism. At the end of the half hour separation occurred between the bud and the spirochaete, the latter continuing to rotate and bend for another ten minutes, but the separated bud

was motionless and corresponded in every particular to the isolated granule clumps to which I have so frequently alluded.

Still later, as one continues to follow the course of events in the batch of ticks, there occurs a period of a few days during which either no spirochaetes at all can be detected or only very rare ones which are seldom motile. Next, and most prominently in the case of ticks which have been kept at com-

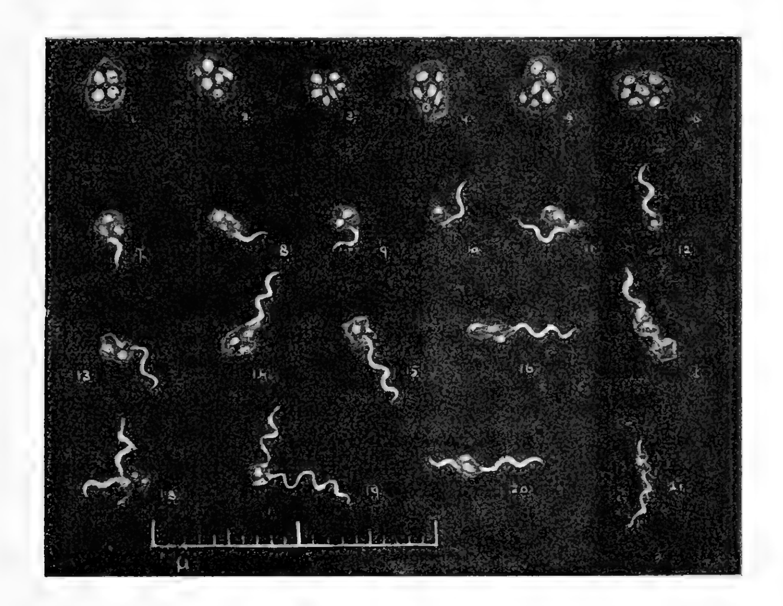


FIGURE I.

Nos 1-6. — « Granule-clumps » from the [tissues of *Ornithodorus moubata*.
Nos 7-10. — Early stage in the extrusion of Spirochaetes from granule-clumps.
Nos 11-21. — More advanced stages of extrusion of Spirochaetes from granule-clumps.

paratively high temperatures' (I have experimented with batches kept at 22°, 24°, 27°, 30°, 32°, 34°, and 37° C.) there appears a sudden re-invasion of the tissues with numerous and vigorously motile spirochaetes. In some instances I have been able to observe that a large proportion of the spirochaetes which re-appear in this sudden and wholesale fashion are very different in size and general appearance from those which were originally ingested by the tick and which retained their mor-

phological characteristics unimpaired as long as they retained their motility. These " young forms", as I may call them, are very much shorter than the others, the smallest being from 3 to 4 μ in length and showing only 2 or 3 curves. They are homogeneous and highly refractile and are usually very motile; when stained they take the colour evenly and deeply. Examples of these forms are drawn in figure II, n°s 8-14.

The following day, or, days, typical large forms are seen in abundance, as well as young forms and others intermediate between the two.

In the course of several such experiments I have seen this second crop of spirochætes disappear more or less completely and, six or seven days later, there followed a repetition of the events I have briefly described above. In other words, regular relapses appear to take place in the body of the tick, as regards the appearance and disappearance of the spirochætes, just as in the case of the warm-blooded host.

In stained specimens of these young forms of spirochætes, both in the earlier and in the recent series of experiments, some have been seen which were in apparent connection with a chromatin granule or clump of granules, suggesting to my mind a possible development of such a spirochæte from the granule. In the recent work with dark-ground illumination a careful watch has naturally been kept for the occurrence of such forms and in four ticks, two of them members of the same batch and the other members of different batches and different experiments, I have observed the forms drawn in fig. I, n°s 7-21 and in fig. II, n°s 1-7.

It will be seen from these sketches that many forms have been observed, from the apparent extrusion of a short, highly-refractile tail from the granule clump (fig. I, n°s 7-10) up to typical spirochaete forms showing numerous and regular curves. The forms figured were, with hardly an exception, in active movement at the time of their observation, the longer ones showing the characteristic rotatory and bending movement of the ordinary blood-forms. The observations were made on the fluids of the tick or on freshly crushed tissues suspended in a drop of normal salt solution, the slides being immediatly

ringed with vaseline and placed on the stage of the microscope in a specially constructed thermostat. In most cases the granule clump was situated at one end of the spirochaete, but in some (fig. I, nos 18-21, and fig. II, nos 5-7) it was placed either centrally or sub-terminally.

In these four ticks, besides the forms connected with the granules, there were also present other spirochaetes of all sizes, from the shortest young forms to large forms indistinguishable

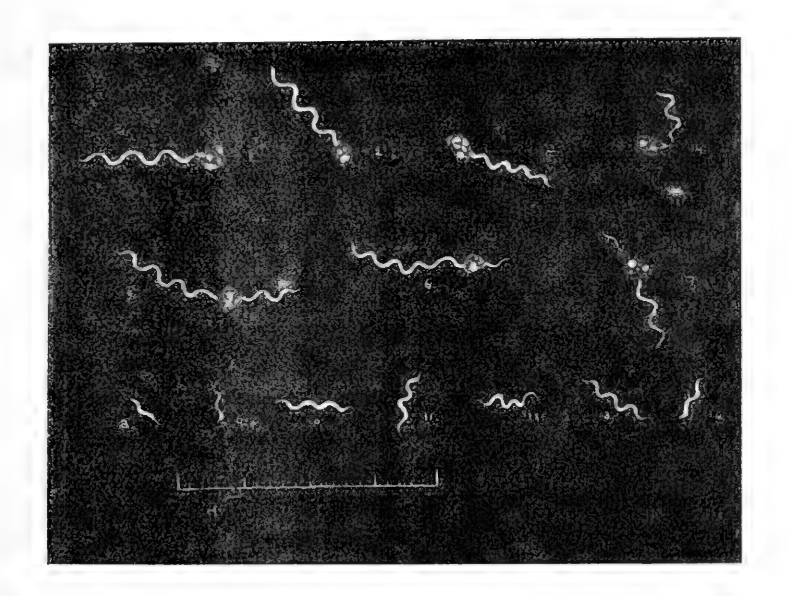


FIGURE II.

Nos 1-7. — Longer forms of Spirochaetes, in association with granule-clumps.
Nos 8-14. — Young Spirochaetes.

from those seen in the blood of a mouse or a monkey. They were all highly refractile and quite homogeneous in appearance. The granule clumps associated with the spirochaetes showed no obvious difference from those commonly found, with the exception that they were somewhat smaller and the number of granules fewer; they gave the impression that a portion of the granular substance was used up in the formation of the new spirochaete.

Although individual specimens were watched continuously

for several hours I was not successful in observing any evidence of progressive growth or development in these motile forms nor their final separation from the granule clump as free spirochaetes. I was inclined to attribute this to the fact that the conditions of the experiment did not sufficiently closely reproduce those of the body of the tick; this is the more probable since even the fully formed long spirochaetes lost their motility in a few hours. Most likely the principal inhibiting agency was the strong light to which they were exposed during the hours of continuous examination.

These forms cannot, I think, be explained on the alternative assumption that they represent a retrograde or degenerative change in pre-formed, adult spirochaetes. Such a view would seem to be negatived by the facts that, for some days before they appeared, spirochaetes had been either absent or extremely rare in the other ticks of the same batch and that, in the days following the one on which such forms were seen, the tissues of the other ticks of the batch were, once again, seen to be swarming with actively motile spirochaetes. No trace of dead or degenerate spirochaetes was found at the time these forms were observed.

Although the complete observation of the development of young motile spirochaetes from the granule clumps has not yet been made, I think that the forms I have here described and figured constitute a strong support of the view put forward in my earlier contributions, namely, that some of these clumps represent a stage in a cycle of development of *Spirochaeta duttoni* in the tick.

Postscript : I cannot conclude this Note without saying with what sincere pleasure it has been contributed to the Volume, as asmall token of the deep respect and admiration which I entertain for M. Metchnikoff and his work.

Royal Army Medical College. London, May 1914.

REFERENCES

[1] W. B. LEISHMAN. Preliminary Note on experiments in connection with the Transmission of Tick Fever. *Journal of the Royal Army Medical Corps.* Vol. XII, p. 123, 1909.

— The mechanism of infection in Tick Fever and the Hereditary Transmission of *Spirochaeta duttoni* in the Tick. *Transactions Society of Tropical Medicine and Hygiene.* Vol. III, p. 77, 1910.

[2] E. HINDLE. The transmission of *Spirochaeta duttoni*. *Parasitology.* Vol. IV, p. 133, 1912.

[3] H. B. FANTHAM. Some researches on the life-cycle of Spirochaetes. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* Vol. V, p. 479, 1911.

[4] A. BALFOUR. Spirochaetosis of Sudanese fowls. *4th Report of the Welcome Tropical Research Laboratories.* Khartoum. Vol. A, p. 76, 1911.

[5] E. MARCHOUX et L. COUVY. Argas et spirochètes. *Annales de l'Institut Pasteur.* Vol. XXVI, p. 450, 1913.

[6] F. K. KLEINE et B. ECKARD. Ueber die Lokalisation der Spirochäten in der Rückfallfieberzecke. *Zeitschrift für Hygiene.* Vol. LXXIV, p. 389, 1913.

[7] O. WITTROCK. Beitrag zur Biologie der Spirochaeta des Rückfallfiebers. *Zeitschrift für Hygiene.* Vol. LXXIV, p. 55, 1913.

[8] J. L. TODD. A Note on the Transmission of Spirochaetosis. *Proceedings. Society of Experimental Biology.* Vol. X, p. 134. 1913.

[9] A. BALFOUR. Resistant forms of *Treponema pallidum*. Granule-shedding. *Journal of the Royal Army Medical Corps.* Vol. XVI, p. 695, 1911.

— W. R. O'FARREL et A. BALFOUR. Granule-shedding in *Treponema pallidum* and associated Spirochaetae. *Journal of the Royal Army Medical Corps.* Vol. XVII, p. 225, 1911.

LES COMPLEXES VÉGÉTAUX ET LEURS DISJONCTIONS PAR LA VIEILLESSE

par L. BLARINGHEM.

Dans ses *Études sur la nature humaine* (1903), et mieux encore peut-être dans une « Revue » publiée dans l'*Année biologique* (1897), M Élie Metchnikoff a montré, d'une manière saisissante, les désharmonies de certains organismes, jeunes, adultes et surtout âgés, désharmonies qui causent une grande partie des accidents, des maladies et souvent la mort. Des *Recherches sur les organismes inférieurs* de M. Jean Massart (1905) ont précisé les liaisons qui existent, dans l'évolution d'une même cellule, entre les modes d'alimentation, la sexualité et la mortalité. Vers la même époque, Noël Bernard (1902-1910), puis M. Is. Gallaud (1904) nous faisaient connaître des associations complexes de végétaux offrant tous les termes entre une symbiose avantageuse à deux êtres (plante supérieure et champignon) liés d'une manière indissoluble et le déséquilibre accidentel ou fatal entraînant la mort de l'une des deux parties, dont l'autre était devenue parasite. Je voudrais ajouter, à ces preuves de la généralité des désharmonies dans la nature, quelques faits rencontrés au cours de mes études de ces dernières années, qui montrent comment naissent, croissent et meurent certaines associations végétales fort remarquables, qu'on sait réaliser expérimentalement.

*
* *

Le Cytise d'Adam est une plante chimère très commune à laquelle on a donné un nom spécifique *Cytisus Adami*, bien qu'on n'en ait jamais possédé qu'un seul individu. Depuis un siècle on le multiplie par bourgeons greffés sur le Cytise ordinaire à fleurs jaunes (*Cytisus Laburnum*). Les jeunes arbustes,

provenant de greffes récentes, n'offrent rien de remarquable, ils donnent en quantité des rameaux, des feuilles et des grappes de fleurs mauves, toutes stériles. Je n'ai récolté des fruits de cet individu qu'en 1911, année très chaude, fruits vides d'ailleurs où l'on pouvait remarquer les traces de la piqûre d'un insecte; ils s'étaient développés comme une galle.

Les Cytises d'Adam provenant de greffes âgées de quinze ans, présentent presque tous le phénomène de disjonction. D'une branche grêle et sèche, couverte de ramilles fleuries en mauve, partent comme des jets (ou gourmands) une ou quelques branches beaucoup plus vigoureuses, plus vertes, à feuilles plus larges, qui fleurissent l'année suivante en belles grappes jaunes, caractéristiques du *Cytisus Laburnum*; avec l'âge, ces branches l'emportent sur celles du Cytise d'Adam, et, à trente ans, un tiers ou un quart de l'arbuste a fait retour au *Cytisus Laburnum* dont toutes les grappes sont fertiles.

Vers le même âge, mais beaucoup plus rarement, apparaissent sur d'autres branches du Cytise d'Adam des ramilles disposées en touffes analogues à certaines associations parasitaires (Balais de sorcière ou Gui), où l'on reconnaît sans peine le Genêt nain à petites feuilles (*Cytisus purpureus*) dont les fleurs violettes sont dispersées et isolées, au lieu d'être groupées en grappes.

J'ai observé ces deux modes de disjonction, depuis 1910, sur un Cytise d'Adam du Laboratoire de chimie végétale de Meudon dont la plantation remonte à plus de trente ans; j'ai planté dans le même jardin une douzaine de Cytises d'Adam greffés sur des tiges vigoureuses de *Cytisus Laburnum* depuis cinq ans (1909). Sur le premier arbuste, la disjonction a lieu chaque année sans exception depuis 1910; sur les autres, elle ne s'est pas encore produite bien que toutes les greffes du Cytise d'Adam soient des fragments d'un seul individu.

La vieillesse, ou mieux, l'âge avancé de la greffe seul entraîne la dégénérescence, qui se traduit ici par la disjonction végétative du Cytise d'Adam en ses parents présumés, le *Cytisus Laburnum* et le *C. purpureus*, deux *espèces très différentes* qui sont classées dans deux sections du genre polymorphe *Cytisus*. Les essais d'hybridation tentés depuis un siècle n'ont jamais donné de résultat positif, et on ne sait même pas si *Cytisus*

Adami est réellement un hybride sexuel des deux espèces citées ; la stérilité et les disjonctions qui viennent d'être rappelées ont fait accréditer cette opinion.

D'ailleurs le Cytise d'Adam joue ; il donne des variations nouvelles de bourgeons autres que des retours aux parents présumés. On a signalé sa tendance à la production de fleurs doubles ; après un traumatisme important fait en 1908, le *Cytisus Adami* âgé de trente ans, de la Station de chimie végétale de Meudon, donne chaque année des pousses d'une nouvelle forme, le *Cytisus Adami f. bracteata*, à grappes épaissies, à fleurs munies de bractées allongées, qu'on devine à peine sur le type *C. Adami*. J'ai décrit (1911) et figuré cette forme dans un mémoire détaillé (fig. 1).

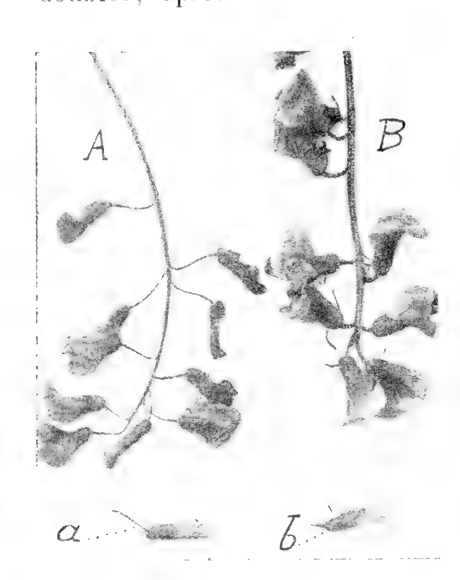


Fig. 1. — En A, grappe de fleurs du *Cytisus Adami* ordinaire de Meudon ; en B, grappe à axe épaissi et à pédoncules courts de la variation de bourgeon développée après un traumatisme sur le même arbre. En *a* et en *b*, j'ai représenté deux fleurs mettant en évidence les bractées calycinales du type *b* qui ont fait donner le nom *bracteata* à cette forme.

*
* *

Par des hybridations entre espèces de céréales très divergentes, entre des Orges à épis à deux rangs et des Orges à épis à six rangs par exemple, j'ai obtenu des individus peu fertiles et, en semant leurs graines, des lignées offrant aussi la dissociation végétative des caractères des parents. Mais ce qui est plus intéressant, c'est que les termes de cette dissociation n'apparaissent pas au hasard des circonstances. Dans l'exemple cité, les bases des épis sont toujours du type des Orges à six rangs (*Hordeum tetrastichum* L.) tandis que les pointes des épis sont du type de l'Orge à deux rangs (*H. distichum* L.). Beaucoup d'épillets sont avortés, surtout dans les portions

d'épis qui présentent la mosaïque des deux caractères (fig. 2).

L'hétérogénéité des métis est moins sensible. Ainsi, pour les caractères ornementaux (caractères dits de variétés) des grains d'Orges, indépendants de l'ensemble des caractères d'organisation (caractères dits spécifiques) on constate d'ordinaire la dominance dans la première génération hybride, puis la ségrégation sur des individus différents à la seconde génération et aux générations suivantes (Lois de Mendel). J'ai montré (1909) que la disjonction végétative (sur un même individu) était caractéristique d'hybrides entre espèces offrant des organisations divergentes et que l'on sait même distinguer des spéciéités de degrés plus ou moins élevés, en notant l'absence ou la fréquence de ces disjonctions végétatives (1911), indice qui complète ceux que Naudin (1858) a tirés de la stérilité plus ou moins grande des produits hybrides.

Fig. 2. — Schéma des épis de l'hybride : Orge à six rangs croisé avec l'Orge à deux rangs (*Hordeum tetrastichum* 0.1231 × *H. distichum nutans* 0.202), où l'on a mis en évidence la stérilité des épillets et leur distribution au bas des épis selon le mode *tetrastichum*, à la pointe des épis selon le mode *distichum*.

Dans des recherches connexes, j'ai pu constater que des hybrides fixés d'Orges et de Blés homogènes et bien définis en certaines localités, sous un climat et sur un sol déterminés, présentaient cette disjonction végétative lorsqu'on s'efforçait de les acclimater dans des régions très

différentes. L'hybride Orge *Svanhals* (de l'espèce *H. distichum erectum*), stable à Svalof (Suède) et contrôlé depuis vingt ans, reste stable dans le Nord de l'Allemagne; mais il se disjoint sous la forme végétative lorsqu'on l'acclimate dans le Nord de la France. La disjonction est accélérée dans les terrains calcaires des environs de Péronne et elle est encore plus accusée au sud de Paris, dans la Sarthe, au point de rendre nécessaire le renouvellement chaque année des semences dégénérées. Des accidents du même ordre, aussi intenses mais plus difficiles à analyser, se produisent dans l'acclimatation des variétés de Pommes de terre à fécule d'Allemagne dans l'Ile-de-France. Ces variétés sont ici des bourgeons multipliés par une fragmentation répétée d'un même individu hybride dont les ascendants sont mal connus (1).

La dégénérescence végétative de l'hybride présumé *Cytisus Adami*, celle des hybrides vrais réalisés expérimentalement d'Orges et de Blés, celle des individus hybrides de Pommes de terre, qui nous apparaissent comme la conséquence des changements de climat et de sol se produisent toujours, mais plus ou moins rapidement, lorsque les plantes vieillissent. Le sélectionneur éprouve de grandes difficultés à conserver indéfiniment par tubercules ou par greffes les meilleures variétés bien acclimatées de Pommes de terre, de Poiriers, de Vignes, d'Abricotiers, etc., bien que ces variétés ne soient pas des variétés au sens propre du mot. La disjonction affecte les fragments d'individus dont la naissance remonte à quelques dizaines d'années (Pommes de terre), à quelques vingtaines d'années (Poiriers et Vignes), à un siècle ou deux (Abricotiers). Après une longue période de prospérité et de succès, lorsque la dégénérescence de quelques fragments commence et se poursuit, il faut s'attendre à la disparition prochaine de tous les fragments, à la disparition de l'individu qui approche du terme de sa vie.

Il importe de savoir que les effets du climat, du terrain, de la sécheresse ou de l'humidité, et surtout les alternances brusques de ces divers facteurs, s'ajoutent à la progression

(1) Ce que j'ai observé sur le *Cytisus Adami* de Bellevue ne me permet pas de croire que les retours sont toujours du type des ascendants.

normale de la désorganisation interne et en accélèrent les conséquences. Et si ces effets s'ajoutent, ils doivent pouvoir se retrancher. Par des soins culturaux convenables, par une alimentation choisie, par un renouvellement fréquent de greffes jeunes (cas du Cytise d'Adam), on peut retarder indéfiniment, comme Calkins l'a fait pour les Infusoires, la déchéance caractéristique de la vieillesse.

* * *

Charles Naudin (1859), qui a découvert l'*hybridité disjointe*, en donne l'explication suivante, admise sans réserves par tous les biologistes modernes :

« Une plante hybride est un individu où se trouvent réunies deux essences différentes, ayant chacune leur mode de végétation et leur finalité particulière, qui se contrarient mutuellement et sont sans cesse en lutte pour se dégager l'une de de l'autre. L'hybride, dans cette hypothèse, serait une mosaïque vivante dont l'œil ne discerne pas les éléments discordants tant qu'ils restent entremêlés; mais si, par suite de leurs affinités, les éléments de même espèce se rapprochent, s'agglomèrent en masses un peu considérables, il pourra en résulter des parties discernables à l'œil quelquefois des organes entiers, ainsi que nous le voyons dans le *Cytisus Adami*... »

L'analyse anatomique des tissus de plantes hybrides confirme l'hypothèse de Naudin. E. Baur, Brandza, Buder et surtout Mac Farlane (1895) en ont donné des preuves; j'en ai réuni de deux sortes tirées d'un matériel hybride réalisé par moi-même.

Dans le Blé hybride stérile, que j'ai obtenu le premier entre l'Engrain (*Triticum monococcum*) et le Blé dur (*Tr. durum*), j'ai retrouvé entre les faisceaux vasculaires du *monococcum* des piliers de sclérenchyme à cellules épaissies de *Tr. durum* (fig. 3) et, en plus, un tissu collenchymateux qui n'existe que chez le *monococcum* jeune; cet hybride stérile est une mosaïque de tissus âgés et jeunes des parents et la présence des jeunes tissus explique peut-être la stérilité (Blaringhem, 1914).

De même, les hybrides de *Cavia Aperea* × *Cav. Cobaya* obtenus dans les élevages de M. Prévot, à Garches (Seine-et-Oise), offrent une mosaïque, très nette sur les dissections des

membres, des muscles et du tissu adipeux des parents. M. Chatanay et moi-même avons fait sur ces animaux des observations, relatives à la juxtaposition de ces tissus et à leur groupement chez les animaux jeunes et adultes, qui seront prochainement publiées. Elles confirment tout ce qui est vérifié depuis cinquante années concernant l'indépendance des tissus des parents chez les *hybrides d'espèces* de végétaux.

Mais c'est surtout chez les végétaux cultivés qu'on reconnaît le mieux les lois générales de cette disjonction et le mécanisme de la séparation des essences spécifiques différentes. En voici un exemple choisi parmi beaucoup d'autres.

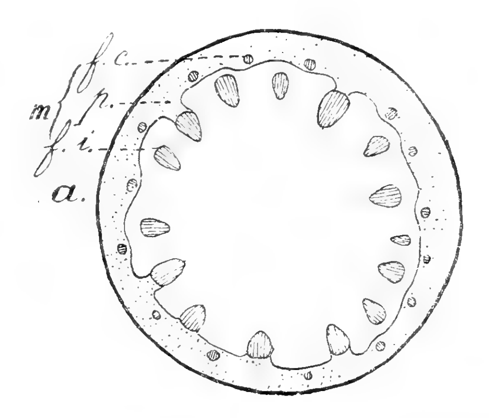


Fig. 3. — Coupe schématique de la base d'un chaume de l'hybride stérile *Triticum monococcum* × *Tr. durum*, où l'on voit les faisceaux libéroligneux *f. c.* et *f. i.*, caractéristiques de l'Engrain (*Tr. monococcum*) englobant un faisceau épais soutenu par un pilier de sclérenchyme *p.*, caractéristique du *Triticum durum*.

Les Blés du Sud de la Russie, dits de Taganrog, très recherchés par les minoteries et les semouleries, font prime sur le marché de Marseille; on s'est donc efforcé de les multiplier et cela sous deux climats très différents, en Algérie et dans le Centre de la France. La lenteur relative de la croissance de ces Blés et la nécessité d'en obtenir un rendement élevé les a fait cultiver dans les deux régions comme des Blés d'automne. En Algérie, dans ces conditions, le Blé de Taganrog devient en quelques années un véritable blé dur (*Triticum durum* Desf.) qu'on ne saurait plus distinguer des Blés cultivés depuis cinquante années dans la vallée du Chélif sous le nom de Blé

Macaroni. Les mêmes Blés, cultivés après la récolte des Betteraves dans les environs de Clermont-Ferrand par les sélectionneurs très avisés qui exploitent les domaines des Sucreries de Bourdon, deviennent, en deux ou trois générations, des Blés Poulards (*Trit. turgidum* L.), appelés encore Blés anglais, qui n'ont plus aucun caractère de Blés durs.

La disjonction se produit sous l'influence immédiate de l'hiver, du froid, de l'humidité et surtout de l'évaporation plus ou moins rapide de l'eau absorbée par les plantes. Beaucoup de travaux ont mis en évidence la réaction immédiate et totale des tissus végétatifs à ces agents externes et on conçoit fort bien comment le climat sec de l'Algérie détermine, dans la plante hybride dépaysée, la formation de larges faisceaux libéroligneux à grands vaisseaux entourés rapidement d'anneaux épais de sclérenchyme, alors que les faisceaux libéroligneux plus petits, mais plus nombreux, du *Triticum turgidum* se trouvent favorisés par les semis d'automne, par un séjour plus ou moins prolongé sous la neige et surtout par la riche fumure qui retient l'eau dans les chaumes et ralentit leur maturation, conditions spéciales de croissance rencontrées dans les fertiles plaines de la Limagne.

*
* *

Les chimères végétales réalisées récemment par Winkler (1909) à Tubingen, qui sont des complexes de tissus végétaux associés par la greffe (1) et se comportent comme les hybrides offrant la mosaïque, permettent d'étendre à d'autres phénomènes les règles de la disjonction végétative à la suite du vieillissement, dont les effets peuvent être accélérés ou retardés par les facteurs externes. Rapprochées de mes observations et expériences sur les hybrides, elles m'ont permis d'interpréter d'une manière nouvelle les rapports de certains parasites très spécialisés avec leurs hôtes.

(1) M. Winkler a fabriqué, par la greffe, des bourgeons de Tomate à charpente de Tomate recouverte de deux couches de cellules de Morelle noire = *Solanum Koelreuterianum*, des bourgeons de Morelle noire à charpente de Morelle noire recouverte par l'épiderme de la Tomate = *Solanum Tubingense*. Ces bourgeons chimères sont propagés par centaines comme le *Cytisus Adami*, sans disjonction, si l'on empêche la floraison et le vieillissement.

Les Rouilles des Céréales (Puccinies), très polymorphes, sont spécialisées au point que certaine forme qui attaque le Blé se propage mal ou pas sur l'Avoine et réciproquement, même après une série de passages sur des hôtes différents. Elles doivent présenter, en plus de la contamination précédant immédiatement les crises de Rouille, des moyens de propagation que le botaniste suédois Eriksson (1901-1912) croit avoir décelé dans les semences. La théorie d'un *mycoplasma* intimement fusionné au plasma des cellules hôtes est sans doute encore mal étayée; mais il est certain que les tissus de l'hôte et ceux du parasite peuvent croître végétativement et longtemps entremêlés sans dommage apparent pour les deux individus. C'est du moins ce qui se passe régulièrement pour certains charbons, pour la Carie, pour le Champignon de l'Ivraie (*Lolium temulentum*, etc., (Blaringhem, 1912). Or, pour les Charbons, pour le Champignon de l'Ivraie, pour les Rouilles aussi, il y a des périodes d'explosions qui sont intimement liées à la maturation sexuelle des plantes hôtes (1). De même, il arrive que des crises de Rouille ou de Charbon très intenses déterminent la sporulation des Champignons dès la première jeunesse de la plante hôte, qui meurt prématurément.

En un mot, les complexes (Plante hôte + Charbon) (Plante hôte + Puccinie) se dissocient dans certaines conditions anormales de croissance et lorsque l'un ou l'autre des membres du complexe approche de la maturation sexuelle (vieillesse).

C. Klebs (1898) a montré qu'une alimentation abondante, très aqueuse, empêchait les Champignons (non parasites) de fructifier. La règle est sans doute valable pour les Champignons parasites.

On sait, d'autre part, que la composition chimique des végétaux (Céréales) en croissance végétative (formation de feuilles et de jeunes chaumes) est pauvre en cendres mais riche en nitrates, que celle des végétaux sur le point de fleurir est riche en sucres et en phosphates. On conçoit ainsi comment se maintient l'équilibre chimique riche en eau et pauvre en sucre caractéristique de la jeunesse du complexe (Céréale + Charbon) et comment se disjoint le complexe

(1) Les phénomènes de *castration parasitaire*, étudiés par A. Giard chez les animaux, rentrent dans la même série de phénomènes.

(Céréale + Charbon) à la période de maturité sexuelle préparée par un milieu interne pauvre en eau (physiologique d'après Scimper) et riche en sucre. L'état de vieillesse facilite la maturation du Champignon (sporulation des Charbons), ou élimine le Champignon et provoque la maturation hâtive des graines de la Céréale (cas probable du Maïs au nord de Paris).

Des expériences réalisées avec la Guimauve, dont les graines stérilisées extérieurement ont été ensemencées dans un milieu stérile, ont permis de reconnaître la présence de la Rouille (*Puccinia Malvacearum*) sur des plantules dont les cotylédons n'étaient pas tombés (Blaringhem, 1913). Les pustules de Rouille apparaissent dans les tubes renfermant, en plus de la solution Knop nutritive normale, une proportion de 5 p. 100 de saccharose ou de glucose. La tension osmotique des tissus, desséchés par cette addition, provoque l'état de vieillesse dans les tissus jeunes et détermine la séparation prématurée des éléments du complexe (Guimauve + Puccinie), séparation qu'on ne constate en général qu'assez tard dans la vie de la Guimauve.

Mais les Rouilles et les Charbons, présents dans les tissus jeunes, ne nuisent en rien à la croissance végétative des hôtes et il suffira de trouver les conditions qui empêchent la fructification des parasites pour atténuer, dans une très large mesure, les dommages que ces parasites causent à l'agriculture. L'abondance, dans les solutions du sol, de sels de chaux qui abaissent la tension osmotique paraît limiter les dommages de la Rouille; elle semble diminuer aussi le rendement en grains des céréales et ces deux résultats sont probablement la conséquence d'une même cause physico-chimique.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1902. Bernard (Noel). — Études sur la tubérisation. *Revue génér. de Bot.*, t. XIV, 1902 et *Thèse Fac. Sciences Paris*, 1902.

1904. Bernard (Noel). — Recherches expérimentales sur les Orchidées, *Revue gén. Bot.*, t. XVI, 1904.

1910. Bernard (Noel). — L'évolution dans la symbiose; les Orchidées et leurs Champignons commensaux. *Ann. Sc. nat. Bot.*, 9e sér. t. IX, 1910, 196 p. et 4 planches.

1909. Blaringhem (L.). — Sur les hybrides d'Orges et la loi de Mendel. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 148, p. 854.

1911. Blaringhem (L.). — La notion d'espèce et la disjonction des hybrides, d'après Ch. Naudin. *Progressus rei botanicæ*, t. IV, p. 27-108.

1911. Blaringhem (L.). — Sur l'hérédité en mosaïque. *IVe Conférence intern. de Génétique*, octobre 1911, Paris, *Rapports*, p. 101-131.

1912. Blaringhem (L.). — L'hérédité des maladies des plantes et le mendélisme. *Rapp. du Ier Congrès de Pathologie comparée*, I, p. 250-312.

1913. Blaringhem (L.). — Sur la transmission héréditaire de la Rouille de la Rose Trémière. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 157, p. 1536.

1914. Blaringhem (L.). — Valeur spécifique des groupements de Blés. *Mémoires Lab. Biologie agricole de l'Institut Pasteur*, I, 1914, 100 p.

1901. Eriksson (J.). — Sur l'origine de la propagation de la Rouille des Céréales par la semence. *Ann. Soc. nat., Bot.*, 1901-1902, t. XIV et XV, 284 p. et 7 pl.

1904. Gallaud (I.). — Études sur les mycorhizes endotrophes. *Revue générale de botanique*, t. XVII, 1905 et *Thèse Fac. Sciences Paris*, 1904.

1898. Klebs (G.). — Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze. *Pringsheim's Jahrbücher*, 1898.

1905. Massart (El.). — Recherches sur les Organismes inférieurs. VI. Considérations théoriques sur l'origine polyphylétique des modes d'alimentation de la sexualité et de la mortalité chez les Organismes inférieurs. *Bulletin du Jardin botanique de l'État, à Bruxelles*, vol. I, fascicule 6.

1897. Metchnikoff (Él.). — Revue de quelques travaux sur la dégénérescence sénile. *Année biologique*, p. 249-266.

1903. Metchnikoff (Él.). — Études sur la nature humaine. Essai de philosophie optimiste, 1 vol., Paris, 399 pages.

1858. Naudin (Ch.). — Considérations générales sur l'Espèce et la Variété. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 46.

1859. Naudin (Ch.). — Observation d'un cas remarquable d'hybridité disjointe. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 49.

1863. Naudin (Ch.). — Nouvelles recherches sur l'hybridité des végétaux. *Ann. Soc. nat., Bot.*, 4e sér. t. XIX, p. 180-203.

1909. Winkler (H.). — Weitere Mittheilungen über Propfbastarde. *Zeits. für Botanik*, t. 1, p. 315-345.

ÉTUDE DES PRODUITS DE DÉGRADATION DIASTASIQUE DE L'INULINE DANS LA RACINE DE CHICORÉE

par J. WOLFF et B. GESLIN.

INTRODUCTION

Parmi les aliments hydrocarbonés de réserve des végétaux, l'amidon passait jusqu'ici pour occuper une place prépondérante. Toutefois l'inuline possède une valeur nutritive égale, et sa présence est aussi nécessaire chez certains végétaux que celle de l'amidon chez d'autres. L'amidon, plus répandu dans la nature, plus anciennement connu, attira davantage l'attention des chercheurs; aussi un grand nombre d'observations et de travaux ont-ils été publiés sur ce sujet; mais ce n'est pas ici le lieu de les citer ou de les commenter.

Nous nous bornerons à mentionner, au cours de ce travail, ceux qui nous paraîtront se rattacher plus directement à notre étude. Jusqu'à présent, l'inuline et ses dérivés ont plutôt fait l'objet de recherches dans le domaine de la chimie pure. Citons à ce point de vue les remarquables travaux de Tanret (1). L'étude de la transformation de l'inuline sous l'influence des diastases a été abordée, pour la première fois, par J. Reynolds Green (2). Cet auteur a mis en relief le rôle physiologique d'un enzyme spécifique de l'inuline; il lui donna le nom d' « *inulase* », sa fonction essentielle consistant, selon lui, à transformer l'inuline en lévulose.

Les recherches de Green ont porté plus particulièrement sur les tubercules de topinambour dans le premier stade de développement de la plante. Green n'observa d'ailleurs qu'une action

(1) TANRET, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 117, p. 50, 1893.
(2) *The soluble ferments and fermentation*. Cambridge, 1899, p. 75.

saccharifiante fort lente; il insiste du reste lui-même sur la faible quantité d' « inulase » entrant en jeu.

D'autre part, il constata (en dehors du sucre produit et de l'inuline non attaquée) la présence d'un corps nouveau dont il put caractériser quelques propriétés physiques :

1° Plus grande solubilité dans l'eau que l'inuline;
2° Dialyse réalisable;
3° Structure cristalline particulière;
4° Solubilité dans l'alcool à 65°;
6° Précipitation par l'alcool à 82°.

De notre côté, nous avons étudié les relations de l'inuline avec les diastases qui l'accompagnent dans les végétaux.

Le rôle et les propriétés des produits de dégradation prenant naissance dans ces conditions nous ont paru mériter une étude physiologique plus complète et plus approfondie que celle qui en a été faite jusqu'ici.

La racine de chicorée étant une des racines où les hydrates de carbone s'accumulent le plus au moment de la maturité, nous l'avons choisie de préférence pour suivre les transformations de l'inuline sous l'influence d'agents diastasiques.

D'après les observations de l'un de nous (1), nous savons qu'aussitôt après l'arrachage des racines, dans le courant d'octobre, le suc qui en découle se coagule aisément, se prend même en masse, et que cette tendance à la coagulation s'atténue avec le temps.

Ainsi, 3 à 4 semaines après l'arrachage, une partie de l'inuline se dépose encore (sans se coaguler) dans le jus abandonné à lui-même, tandis qu'une autre partie a déjà subi une modification profonde.

Bien que, sous des influences physiologiques encore mal définies, la transformation de l'inuline soit déjà très avancée, il est encore difficile de mettre en évidence à ce moment l'action des diastases *saccharifiantes*; elles existent certainement, mais elles sont encore très peu actives à cette période. Un mois après, si on examine un nouveau suc, toujours du même lot de racines, on constate une proportion de sucre réducteur

(1) J. Wolff, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 162, p. 514, 1916.

beaucoup plus considérable, en même temps qu'une activité diastasique *saccharifiante* très remarquable.

On note en outre, au bout de cette nouvelle période, une plus forte proportion d'inuline transformée, mais non saccharifiée.

Le travail qui s'accomplit avec le temps dans la racine de chicorée à partir de l'arrachage, s'est donc manifesté à nous en deux phases bien distinctes (à l'étude desquelles nous nous consacrerons principalement).

Cette étude nous permet de montrer que l'inuline, aliment de réserve, est à la base de tous les produits similaires auxquels on peut la trouver associée dans les végétaux ; que sa dégradation et celle des produits en dérivant se poursuit d'une façon continue, sous l'influence d'agents diastasiques mal déterminés encore pour aboutir au terme « hexose » (en majeure partie du lévulose) ; que les produits de dégradation non réducteurs, qui prennent naissance aux dépens de l'inuline, se transforment en sucres réducteurs grâce aux propriétés hydrolysantes du suc ; action qu'on peut également produire avec la sucrase extraite de la levure ; que ces mêmes substances fermentent sous l'influence des levures les plus diverses, tout en montrant à l'égard de celles-ci une résistance variable.

Pour la clarté de nos exposés, nous désignerons ces produits sous le nom générique d' « *inulides* », produits se distinguant encore entre eux par leur pouvoir rotatoire et leur plus ou moins grande solubilité dans l'eau et dans l'alcool.

Quelques auteurs (1) ont comparé les corps voisins de l'inuline, ou en dérivant, aux dextrines provenant de l'amidon. Cependant, dans nos expériences, les levures agissent directement sur les « inulides » (2) et en un temps très court, action comparable à celle exercée par les levures sur le saccharose et sur le maltose.

On peut donc considérer nos « inulides » comme des polyoses beaucoup plus rapprochés des sucres que ne le sont les dextrines. On sait du reste que les dextrines provenant de l'amidon ne fermentent pas directement par les levures, sauf dans des cas exceptionnels.

(1) R. GREEN, *Loc. cit.*, p. 81. — G. ANDRÉ, *Chimie végétale*, p. 122.
(2) La synanthrine et l'hélianthénine de Tanret appartiennent certainement au groupe des « inulides ».

Notons également que l'inuline pure en solution dans un bon milieu nutritif n'a jamais fermenté dans nos expériences malgré l'emploi de levures d'origine variée. Enfin, nous démontrerons que la sucrase extraite de la levure a une action nulle sur l'inuline elle-même, tandis qu'elle en possède sur les « inulides » et qu'elle l'exerce à la manière de l'enzyme hydrolysant, contenu normalement dans la racine de chicorée.

Comme, d'autre part, E. Bourquelot (1) a constaté que l'*Aspergillus niger* est capable de saccharifier l'inuline, il semble bien qu'une autre diastase sécrétée par cette moisissure ait préparé le terrain à la sucrase. La formation des « inulides » dans la racine doit avoir pour cause une action diastasique analogue s'exerçant sur l'inuline.

Dès lors, il n'est point téméraire de penser que la sucrase et l'enzyme hydrolysant les « inulides » ne fassent qu'une seule et même substance; que la saccharification de l'inuline attribuée jusqu'à présent à un seul et unique ferment l'« inulase », soit un phénomène plus complexe où le rôle final de la sucrase apparaît nettement. Nous laisserons au lecteur le soin de juger.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE
UN MOIS APRÈS LA RÉCOLTE DES RACINES DE CHICORÉE

Traitement des racines
et préparations du suc un mois après l'arrachage.

Des racines de chicorée (environ 15 kilogrammes), provenant d'un même lot de 50 kilogrammes, sont lavées, brossées, râpées, puis pressées. On recueille environ 8 kilogrammes de suc.

(1) Bourquelot, Les ferments solubles de l'*Aspergillus niger*. *Bullet. Soc. mycologique de France*, t. IX, 4e fasc., 1893.

L'examen au polarimètre du suc déféqué accuse une déviation de — 31° en degrés saccharimétriques.

Le dosage du sucre réducteur (1) dans le suc donne.	1 gr. 20 p. 100
Le dosage du sucre réducteur après hydrolyse donne.	21 gr. 60 p. 100

D'autre part, 500 cent. cubes de sucre sont étendus de leur volume d'eau distillée et les 1.000 cent. cubes résultant de ce mélange sont divisés en deux portions égales (A) et (B).

La portion (A) est réservée aux recherches sur l'inulase.

La portion (B) est débarrassée des matières albuminoïdes par ébullition, filtrée et chauffée à 100° pour en assurer la conservation.

RECHERCHE DE L'INULASE SUR LE SUC FRAIS

Première série d'expériences sur la portion A, c'est-à-dire sur le suc fraîchement préparé étendu de son volume d'eau distillée.

Dispositif. — Diviser exactement 500 cent. cubes du mélange dans une série de 10 matras de 100 cent. cubes, numérotés de 1 à 10. Chaque récipient contient ainsi 50 cent. cubes de suc étendu, soit 25 cent. cubes de suc pur.

Opération. — On chauffe d'abord jusqu'à ébullition les ballons nos 1 et 2 qui serviront de témoins, ainsi que le n° 3, acidulé au préalable avec 0 c.c. 5 d'acide sulfurique $\frac{N}{10}$ dans le but de transformer une partie des sels neutres du suc en sels acides.

Puis on place dans le bain-marie, réglé à 50°, toute la série

(1) Tous nos dosages de sucre ont été effectués par la méthode de Mohr, modifiée par Gabriel Bertrand.

des ballons nos 1, 2, 3; nos 4, 5, 6; nos 7, 8, 9 et 10, ce dernier acidulé comme le n° 3 de 0 c.c. 5 d'acide sulfurique $\frac{N}{10}$.

Au bout de 1/4 d'heure . . on retire le n° 7
Au bout de 1/2 heure . . . on retire le n° 8
Au bout de 3/4 d'heure . . on retire le n° 9
Au bout de 1 heure . . . on retire le n° 4 et les nos 1, 3, 10
Au bout de 2 heures. . . on retire le n° 5
Au bout de 3 heures . . on retire les nos 6 et 2

Aussitôt retiré du bain-marie chaque ballon est plongé dans l'eau bouillante où il est maintenu pendant cinq minutes afin d'arrêter toute action diastasique ultérieure.

Dosage de la matière réductrice et examen au polarimètre.— Après refroidissement, le contenu de chacun de ces ballons est déféqué à l'acétate de plomb et ramené à 100 cent. cubes à l'aide d'une solution saturée de sulfate sodique. On filtre, on examine au polarimètre et on dose le sucre. Le tableau ci-après indique les résultats; ils diffèrent très peu les uns des autres.

Nos	DEGRÉS saccharimétriques	MATIÈRE RÉDUCTRICE p. 100 de suc pur	DURÉE DU SÉJOUR au bain-marie
1 (Témoin)	— 32°	1,28	1 heure
2 (Témoin)	— 32°	1,28	3 heures
3 (Témoin)	— 32°	1,12	1 heure
4	— 33°2	1,40	1 heure
5	— 34°4	1,58	2 heures
6	— 34°4	1,56	3 heures
7	— 32°8	1,24	1/4 d'heure
8	— 32°	1,40	1/2 heure
9	— 33°2	1,40	3/4 d'heure
10 (Témoin)	— 33°4	1,48	1 heure

Le n° 5, après un séjour d'une heure au bain-marie à 50°, accuse seul une légère augmentation de la matière réductrice. Le pouvoir réducteur du suc est le même après deux heures au bain-marie à 50°, comme on le remarque pour le n° 6.

Les témoins nos 1 et 2, bouillis au préalable, n'accusent aucun changement appréciable. Le témoin acidulé n° 10, après 1 heure au bain-marie à 50°, suit légèrement la progression constatée dans le n° 5. On remarque également une très faible augmentation de la matière réductrice dans les liqueurs des ballons

n°s 8 et 9 restés 1/2 heure et 3/4 d'heure à 50° sans atteindre toutefois le maximum observé 1,58 de sucre p. 100 de suc pur.

De cette première série d'expériences on peut tirer la conclusion que l'*hydrolyse diastasique des produits hydrocarbonés du suc a été très faible*.

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES COMPARATIVES AVEC DU SUC FRAIS NON BOUILLI ET DU SUC BOUILLI EN PRÉSENCE D'UNE PETITE DOSE D'ACIDE ACÉTIQUE.

Le dosage de l'acidité du suc en présence de phtaléine et de l'alcalinité en présence d'orangé III ayant été effectué au préalable d'après la méthode préconisée pour la première fois par M. A. Fernbach (1), nous disposons au bain-marie à 50° une nouvelle série de 4 ballons n°s 1, 2, 3, 4. Les n°s 1 et 3 contiennent : 25 cent. cubes de suc non bouilli, additionné de 1 cent. cube d'acide acétique normal (c'est-à-dire un poids d'acide acétique équivalent à celui d'acide sulfurique nécessaire à la transformation des sels neutres en sels acides). Les ballons n°s 2 et 4 sont préparés de la même façon avec du suc bouilli. Après 1 heure, on retire les ballons 1 et 2; après 2 heures, on retire les ballons 3 et 4.

On stabilise ensuite les liquides par la chaleur. Aussitôt leur retrait du bain-marie on laisse refroidir, on défèque et on ramène le volume à 50 cent. cubes.

Pour connaître également l'action du *suc pur non bouilli* sur le suc bouilli, on prépare de la même manière avec le suc étendu de son volume d'eau, des matras numérotés 5 et 6.

N° 5.	Suc bouilli à 50 p. 100	30	cent. cubes.
	Suc frais nouveau, *non* bouilli	10	—
	Acide acétique normal	1	—
N° 6.	Suc bouilli à 50 p. 100	30	cent. cubes.
	Suc frais nouveau *bouilli*	10	—
	Acide acétique normal	1	—

Ces deux dernières liqueurs, contenant chacune 25 cent. cubes de suc de chicorée pur, sont laissées 15 heures au bain-

(1) Recherches sur la saccharification de l'amidon, par l'amylase du malt. *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, 10 octobre 1899.

marie à 50°, puis stabilisées, déféquées et étendues à 100 cent. cubes.

L'examen au polarimètre et la teneur en sucre réducteur de toutes ces liqueurs sont résumés dans le tableau suivant :

Nos	DEGRÉS saccharimétriques	MATIÈRE RÉDUCTRICE p. 100 de suc pur.	
1	— 37°	1,24	
2	— 37°	**1,14**	*Suc bouilli*
3	— 37°4	1,22	
4	— 36°6	**1,10**	*Suc bouilli*
5	— 36°8	1,64	
6	— 36°	**1,20**	*Suc bouilli*

Ces résultats montrent que l'action diastasique saccharifiante n'a guère été activée par l'addition d'une petite dose d'acide acétique.

ACTION SUR LE SUC DE CHICORÉE DE DEUX LEVURES DÉSIGNÉES PROVISOIREMENT PAR α ET β (α PLUS ACTIVE QUE β)

Nous avons opéré :

a) Sur le suc de chicorée étendu, après chauffage à 100° et clarification (portion B);

b) Sur le même suc additionné d'inuline pure préparée par nous;

c) Sur l'inuline pure en milieu nutritif.

Ces recherches ont pour but de s'assurer :

1° Si la levure produit un enzyme *saccharifiant* spécifique de l'inuline (inulase de Green);

2° Dans quelle mesure les hydrates de carbone contenus dans le suc et dérivant de l'inuline sont susceptibles de fermenter, et quel est le rôle de la levure dans cette action.

Dispositif. — Préparer, avec le suc de chicorée dilué et de l'eau de levure, les mélanges suivants :

2 ballons numérotés 1 et 3 contenant chacun :

Suc de chicorée à 50 p. 100	30 cent. cubes.
Eau de levure	20 —

2 ballons numérotés 2 et 4, contenant chacun :

Suc de chicorée à 50 p. 100.	30 cent. cubes.
Eau de levure	20 —
Inuline pesée.	2 grammes.

2 autres ballons, n°s 5 et 6, avec :

Eau de levure	50 cent. cubes.
Inuline pesée.	2 grammes.

enfin un 7e ballon spécial 1 *bis*, renfermant une quantité double de suc et d'eau de levure, destiné à suivre la marche de la fermentation par la perte de poids du ballon.

Suc de chicorée à 50 p. 100.	60 cent. cubes.
Eau de levure	40 —

Opération. — Toutes ces préparations, chauffées à l'autoclave à 100° pendant 1/4 d'heure, puis refroidies, sont ensemencées :

1° Les n°s 1, 2, 3 et 1 *bis* avec 15 gouttes de levure α;

2° Les n°s 3, 4 et 6 avec 15 gouttes de levure β.

Puis, chacun des récipients étant armé d'un tube à dégagement avec acide sulfurique, est placé à l'étuve réglée à 27°.

En moins de 24 heures, la fermentation est commencée dans les ballons, sauf dans ceux ne renfermant que de l'*inuline pure*, c'est-à-dire dans 5 et 6.

Après 40 heures, le poids du n° 1 *bis* restant constant, nous avons pu constater que la fermentation était complètement terminée et nous avons procédé trois jours après aux divers dosages de l'alcool produit et à l'évaluation de la matière *non* fermentée.

1° Dosage de l'alcool par le procédé Martin (1).

Résultats en volume trouvés pour 15 cent. cubes du suc pur (2).

N^{os}	c.c.
1. Suc de chicorée, avec levure α.	1,19
2. Suc et inuline. d°	1,20
3. Suc de chicorée, avec levure β.	1,071
4. Suc et inuline, d°	1,08
5. Inuline seule, avec levure α	Néant.
6. Inuline seule, avec levure β	Néant.

(1) *Moniteur de Quesneville*, p. 570, 1903 (Voir en Appendice un résumé de la méthode).

(2) Il est utile de signaler une fois pour toutes qu'un essai à blanc avec le suc pur non fermenté ne donne aucun résultat pouvant infirmer nos conclusions.

Trois faits sont acquis :

1° La proportion d'alcool obtenue avec la levure α est sensiblement plus forte que celle obtenue avec la levure β. Le calcul conduit aux résultats suivants :

Avec levure α : 6,40 d'alcool en poids p. 100 de suc, correspondant à 12,80 de matière fermentescible.

Avec levure β : 5,76 d'alcool en poids p. 100 de suc, correspondant à 11,536 de matière fermentescible.

2° La présence de l'inuline ajoutée (2 et 4) n'a pas modifié les résultats.

3° L'inuline pure n'a pas été touchée.

2° Dosage de la matière hydrocarbonée non fermentée

(*sur 15 cent. cubes de suc pur, après déduction, s'il y a lieu, de l'inuline ajoutée*).

Nos		SUCRE en lévulose.	
1	0gr96	0gr96	Après l'action de la levure α.
2	2 69 — 1gr64 (Inuline hydrolysée)	= 1, 05	
3	1 08	1, 08	Après l'action de la levure β.
4	2 82 — 1 64 (Inuline hydrolysée)	= 1, 18	
5	1 64 (Inuline hydrolysée)		

Avant de procéder aux dosages ci-dessus, nous nous sommes assurés qu'il n'y avait plus de sucre réducteur libre n'ayant pas été touché par les levures (les résultats furent absolument négatifs).

Il ressort de ces résultats que la quantité moyenne de matière non fermentée, calculée d'après les chiffres ci-dessus, est égale à 6 gr. 7 p. 100 du suc pur après l'action de la levure α, c'est-à-dire dans les nos 1 et 2, tandis que, dans les ballons nos 3 et 4, après l'action de la levure β, cette quantité est un peu plus élevée et égale à 7 gr. 53 p. 100 du suc pur. Ces résultats indiquent, en outre, que les levures n'ont pas attaqué l'inuline, mais qu'elles ont agi sur des produits provenant vraisemblablement d'une transformation de l'inuline dans la racine même.

On est alors autorisé à penser que les levures sécrètent une diastase hydrolysante, agissant sur ces produits pour les dédoubler, comme la sucrase dédouble le saccharose.

Cette diastase dédoublante est-elle douée de propriétés spécifiques vis-à-vis des produits de dégradation de l'inuline?

C'est ce que nous examinerons dans la suite. Quant à ces produits eux-mêmes, nous les désignerons à l'avenir sous le

nom d' « INULIDES ». Nous résumons ces premiers résultats dans le tableau ci-dessous où la matière réductrice est évaluée en lévulose.

TABLEAU RÉCAPITULATIF

EXPÉRIENCE sur un suc, renfermant 1° à l'origine :

Sucre réducteur	1,20	
Matière hydrocarbonée non réductrice	20,40	
	21,60 p. 100	
2° après action des levures :	α	β
Matières fermentescibles (inulides et sucre réducteur initial).	12,80	11,536
Matières non fermentescibles (inuline et autres).	6,70	7,53
Total.	19,50	19,066
Reste pour matière indéterminée	2,10	2,534
	21.60	21,60

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DEUX MOIS APRÈS LA RÉCOLTE DES RACINES DE CHICORÉE

Rappelons brièvement que, dans le suc que nous venons d'étudier dans la première partie de ce travail, il a été mis en évidence :

1° Une faible proportion de sucre réducteur initial : 1 gr. 2 p. 100 du suc;

2° Une diastase hydrolysante très peu active et très fragile;

3° Une quantité notable de matières hydrocarbonées *non* réductrices, les « *inulides* » attaquables par les levures;

4° De l'inuline non attaquée par les mêmes levures.

Dans de nouveaux essais, nous avons examiné un suc du même lot de racines deux mois après la récolte, c'est-à-dire un mois après l'étude précédente. La marche suivie est sensiblement la même. Mais, tandis que, la première fois, notre examen avait porté sur le suc total exprimé en un seul jet, cette fois-ci nous avons modifié un peu notre technique.

Une première portion de suc a été recueillie aussitôt après

l'expression pour être comparée avec le suc déjà étudié; puis, une deuxième portion fut extraite du résidu de la première expression après 24 heures de séjour sous la presse.

ACTIVITÉ SACCHARIFIANTE DE LA DIASTASE DE LA RACINE DE CHICORÉE

Pour donner une idée de l'activité saccharifiante de la diastase qui s'est développée depuis un mois dans la racine, citons d'abord ce fait :

Le jus de la 1re expression renfermait 3 gr. 4 p. 100 de sucre.
Le jus de la 2e — — 9 gr. 2 p. 100 —

Ainsi, en moins de 24 heures, l'augmentation de sucre a été de 5,8 p. 100 à la température ordinaire (15°), alors que l'écart entre la teneur en hydrates de carbone des deux sucs était insignifiant, le premier en renfermant 22,4 et le deuxième 24,5.

L'action saccharifiante, suivie jour par jour dans ce suc de deuxième expression, s'est continuée à la température moyenne de 12° (température du laboratoire).

Pour prévenir toute altération, le suc avait été conservé sous une couche de toluène.

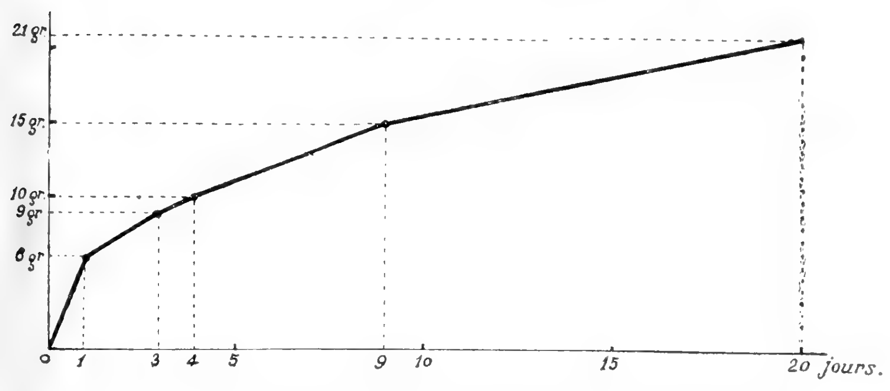
Voici les résultats, représentés par le tableau et le graphique ci-dessous.

	TEMPS après lequel LES EXAMENS ET LES DOSAGES ont été effectués	DEGRÉS SACCHARIMÉTRIQUES	SUCRE réducteur EN LÉVULOSE — p. 100 de suc
Suc de 1re expression. .	0	— 41°4	3,4
Suc de 2e expression . .	24 heures.	— 61°2	9,2
	3 jours.	— 85°	12,4
	4 —	—	13,6
	9 —	—	18,8
	20 —	— 156°	24,5 (1)

(1) Ces 24,5 de sucre en solution convenablement étendue fermentent complètement (le résidu est insignifiant).

Le graphique ci-dessous permet de se rendre compte d'une façon plus saisissante de la marche du phénomène.

Le suc hydrolysé dès le début par un acide donnant 24,5 de sucre réducteur, on voit que la transformation de l'inuline ou de ses dérivés saccharifiables a été complète à une température assez basse, sous l'influence des diastases contenues normalement dans le suc. De plus, la progression dans cette



Quantité de sucre réducteur (en lévulose) formée dans 100 grammes de suc, dans les jours qui suivent la première expression.

transformation en sucre est presque rigoureusement proportionnelle au temps à partir du 2e jusqu'au 9e jour.

Le sucre réducteur passant de 3,4 à 9,2, l'énergie saccharifiante qui s'est manifestée dans les 24 premières heures a été plus considérable que celle qui s'est manifestée dans la suite. Cette action provient en partie, ainsi que nous nous en sommes assurés, de la présence dans la pulpe d'une certaine quantité de diastase saccharifiante ne diffusant pas dans le suc.

Afin de ne pas surcharger ce mémoire, nos expériences à ce sujet seront publiées ailleurs.

Revenons à notre sujet principal.

AGTIVITÉ COMPARÉE DES SUCS « *ANCIEN* » ET « *NOUVEAU* » DE PREMIÈRE EXPRESSION, STABILISÉS OU NON

Cette étude a porté d'abord sur l'activité saccharifiante du nouveau suc non chauffé, étendu de son volume d'eau, comme il a été fait pour l'ancien suc. Mais, pour éviter les longueurs et les redites, nous présentons le résumé de ces expériences dans le tableau ci-après, en rappelant les premiers résultats pour établir leur comparaison avec les nouveaux.

La température à laquelle nous avons opéré étant de 51° (1), nous voyons de suite que l'activité saccharifiante du nouveau suc s'est exercée d'une façon normale. En comparant les chiffres, on se rend compte que, si la diastase saccharifiante manifeste une activité très faible dans le premier suc (elle est à peine appréciable au bout de 2 heures), elle se montre au contraire très active dans le suc nouveau où son action continue pendant 48 heures. Cette diastase hydrolysante s'est donc fortement développée dans la racine depuis 1 mois.

TABLEAU RÉSUMÉ ET COMPARATIF DES RÉSULTATS EXPRIMÉS EN LÉVULOSE

		SUC DE CHICORÉE	
		UN MOIS APRÈS LA RÉCOLTE Suc dit « *Ancien* »	DEUX MOIS APRÈS LA RÉCOLTE Suc dit « *Nouveau* »
Sucre réducteur initial.		1,20	3,40
Sucre réducteur (lévulose) après séjour du suc au bain-marie, à 51°, pendant :			
1 heure.	Témoins.	1,28	3,40
2 heures.	Témoins.	1,28	3,40
24 heures.	Suc bouilli.	1,28	3,40
48 heures.	Suc bouilli.	1,28	3,40
1/2 heure.	Suc non bouilli.	1,40	3,70
1 heure.	Suc non bouilli.	1,40	4
2 heures.	Suc non bouilli.	1,58	4,35
24 heures.	Suc non bouilli.	1,58	8,9
48 heures.	Suc non bouilli.	1,58	10,30

(1) Température voisine de la température optima signalée pour la sucrase, d'après A. Fernbach.

ACTION DE LA LEVURE β SUR LE SUC NOUVEAU RENFERMANT 3,4 P. 100 DE SUCRE RÉDUCTEUR INITIAL

L'opération faite en double n'est que la répétition de celle qui a été effectuée dans la première partie sur le suc ancien (à 1,20 p. 100 de sucre réducteur initial).

Deux matras contenant chacun 25 cent. cubes de suc à 50 p. 100 et 25 cent. cubes d'eau de levure sont chauffés 1/4 d'heure dans la vapeur d'eau à 100° (1). Après refroidissement, on ensemence avec 12 gouttes d'une liqueur contenant de la levure β en suspension. On porte à l'étuve réglée à 27°, puis après 4 jours, on dose : 1° l'alcool ; 2° les hydrates de carbone non fermentés.

L'alcool, dosé par le procédé Martin et ramené au pourcentage du suc pur, donne :

En volume	10,252 p. 100
En poids	8,2 —

Le poids des hydrates de carbone *non fermentés*, ramené à 100 grammes de suc pur est égal à 3 gr. 68 ; il représente les hydrates de carbone après hydrolyse, exprimés en lévulose.

COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS ENTRE LES DEUX SUCS « *ANCIEN* » ET « *NOUVEAU* »

Les chiffres que nous venons d'obtenir et ceux consignés à la fin de la Première Partie, pour le suc ancien, vont nous permettre d'apprécier les changements survenus depuis un mois dans la nature des hydrates de carbone de la racine de chicorée. Tous ces résultats exprimés en lévulose ont été rapportés à 100 grammes de la matière hydrocarbonée des sucs.

Pour le suc ancien à 1 gr. 20 de lévulose initial pour 21,60 d'hydrates de carbone, le poids des hydrates de carbone non fermentescibles était de 7 gr. 53 pour 21,60, soit 34,8 p. 100.

Pour le suc nouveau à 3,40 de lévulose initial pour 22,40

(1) Dans ces conditions, les inulides ne sont pas saccharifiées et la stérilisation est suffisante.

d'hydrates de carbone, le poids des hydrates de carbone non fermentescibles est de 3 gr. 68 pour 22,40, soit 16,4 p. 100.

La différence entre les hydrates de carbone résiduaires (34,8 et 16,4) des deux fermentations (18,4) représente le poids de matière devenue fermentescible grâce au travail qui s'est accompli dans la racine depuis un mois.

D'autres données permettent de contrôler ce résultat et fournissent, en outre, le moyen de déterminer les proportions « d'inulides » et de lévulose ayant pris naissance dans la racine dans l'intervalle de temps compris entre nos deux examens. En doublant, pour chaque suc, le poids d'alcool trouvé, nous aurons très sensiblement, en lévulose, le poids total des matières fermentées. En déduisant de ce poids celui de lévulose préexistant dans chacun des sucs, nous devons pouvoir déterminer la quantité d' « inulides » fermentescibles. La différence entre les nombres obtenus donnera le poids des inulides, évaluées en lévulose, formées depuis un mois. Ainsi :

	1er SUC sur 21,60 D'HYDRATE DE CARBONE	2e SUC sur 22,40 D'HYDRATE DE CARBONE
Matière totale fermentée . . .	11,53	16,404
Lévulose initial à déduire. . .	1,20	3,40
	10,33	13,004
Matière totale fermentée (lévulose déduit), ramenée à 100.	47,8	58,055
Différence.	10,25	

représente l'inuline transformée en « *inulides* » sur 100 grammes de matière hydrocarbonée.

Si, d'une part, nous ramenons de même à 100 grammes de matière hydrocarbonée le lévulose préexistant dans les deux sucs, on aura :

Pour le 1er	5,55 p. 100 de lévulose.
Pour le 2e.	15,10 p. 100 de lévulose.
Différence.	9,55 de lévulose nouveau.

Autrement dit, 9,55 correspondent à une quantité d'inuline nouvellement transformée en lévulose.

Mais, étant donné que l'on se trouve (pour 100 grammes

d'hydrates de carbone du nouveau suc) en présence de 10 gr. 25 d' « inulides » en plus, on doit admettre que le lévulose provient d' « inulides » et non directement de l'inuline.

En additionnant les poids trouvés d' « inulides », calculés en lévulose, et de lévulose, on a 10,25 + 9,55 = 19,8, chiffre très voisin de celui indiqué à la page précédente (18,4).

Nous avons considéré les 9 gr. 55 de lévulose nouveau comme provenant de l'inuline transformée dans la racine depuis un mois; mais on peut aussi envisager l'hypothèse où ce lévulose aurait pour origine les « inulides » fermentescibles du suc primitif — « inulides » que nous retrouverions hydrolysées dans le nouveau suc; dans ce cas nous aurions 19 gr. 8 d' « inulides » nouvelles.

L'hypothèse de cas intermédiaires est également plausible; les « inulides » nouvelles seraient alors comprises entre 10 gr. 25 et 19 gr. 8.

Il résulte de ces expériences comparées que l'inuline se transforme peu à peu dans la racine de chicorée et qu'on la retrouve sous forme d' « *inulides* » et de *lévulose*. Cette transformation paraît bien avoir lieu en deux phases distinctes dont les « inulides » et un « sucre réducteur » constituent les termes principaux.

Nous venons d'acquérir ainsi quelques notions nouvelles au sujet de la nature des produits élaborés dans la racine aux dépens de l'inuline. Comment ces produits prennent-ils naissance et sous quelle influence?

L'expérience ayant pour but de nous fournir quelques renseignements sur les propriétés des diastases qui président aux transformations de l'inuline en « inulides » et de ces dernières en sucre réducteur fermentescible répond à cette question. Cette expérience est condensée dans le tableau suivant, où l'action de la levure est étudiée d'une part sur le suc bouilli au moment de son extraction, et d'autre part sur le même suc non bouilli après un séjour de 20 heures au bain-marie à 51° (1),

(1) Température voisine de la température *optima* (56°) indiquée par A. Fernbach, pour la sucrase. *Thèse*, 1890, Recherches sur la sucrase.

c'est-à-dire après le travail accompli par les diastases du suc. Comme on le verra, ce travail se manifeste surtout par une activité considérable de la diastase hydrolysant les « inulides » ; diastase qui en 20 heures donne naissance à 7 gr. 3 de sucre réducteur pour 100 cent. cubes de suc.

		COMPOSITION DU SUC (1)	
		AU MOMENT de l'extraction (A)	APRÈS 20 HEURES à 51° (B)
Matière hydrocarbonée	non réductrice	19	11,70
	réductrice	3,4	10,70
	Total	22,4	22,4
Après fermentation, par levure β :			
Matière fermentescible		16,4	17,52
Matière non fermentescible		3,68	3,36
Matière indéterminée		2,32	1,52
		22,40	22,40

L'identité presque complète des résultats obtenus permet de tirer les déductions suivantes :

1° Il y a de fortes présomptions pour admettre dans le suc et dans la levure l'existence de la même diastase saccharifiante agissant sur les « *inulides* » et non sur l'*inuline*.

2° La *diastase*, qui a pour fonction de transformer l'inuline en « inulides » dans les tissus de la plante, agit avec une extrême lenteur dans les conditions de l'expérience. (La différence observée entre les produits résiduaires ou de fermentation des sucs A et B est, en effet, minime.)

3° La « *diastase saccharifiante* » ou *hydrolysànte* du suc agit rapidement si on compare son action à la diastase précédente.

En résumé, nos observations relatives à l'action de ces diastases et de la levure font ressortir :

1° Une levure inactive sur l'inuline ;

(1) Tous ces résultats sont exprimés en lévulose p. 100 cent. cubes de suc.

2° La même levure active sur les « inulides »;

3° Une « *diastase saccharifiante du suc* » active sur les « *inulides* » seules comme la « *diastase saccharifiante* » de la levure.

La diastase (contenue soit dans le suc, soit dans la levure) saccharifiant les « inulides » est sans action sur l'inuline elle-même. Ce n'est donc pas l'*inulase* de Green, qui, par définition, doit transformer directement l'inuline en sucre réducteur final (lévulose).

La diastase saccharifiante du suc ou de la levure est également indépendante de la diastase agissant sur l'inuline.

TROISIÈME PARTIE

CLASSIFICATION DES « INULIDES » D'APRÈS LEUR RÉSISTANCE AUX DIVERSES LEVURES

Nous avons vu au cours de ce travail que les sucres résultant de la transformation des « inulides » fermentent jusqu'au bout sous l'influence des levures.

Nous constaterons maintenant que les « inulides » soumises comparativement à diverses races de levure donnent des rendements en alcool très variables, en rapport avec les quantités d' « inulides » disparues.

On peut en déduire que des diastases saccharifiantes d'énergies diverses transforment des « inulides » plus ou moins résistantes en sucres fermentescibles.

Nous avons pu, jusqu'ici, mettre en évidence trois catégories de ces « inulides » suivant les quantités d'alcool fourni par les levures employées.

L'opération a été faite sur un suc renfermant pour 100 cent. cubes : 25 gr. 2 de matières hydrocarbonées, dont 5 grammes de lévulose initial.

Le tableau ci-dessous résume les essais comparatifs effectués sur le suc dilué au 1/4 afin de se placer dans les meilleures

conditions possibles d'expérience. Les levures employées sont les suivantes :

1° Levure apiculée du raisin . . . . (a)
2° Levure de Bourgogne. . . . . (A)
3° Levure annamite (1) . . . . (B)
4° Schizosaccharomyces Pombe . . . . (C)

	ALCOOL en poids pour 100 cent. cubes DE SUC	MATIÈRES HYDROCARBONÉES : exprimées en LÉVULOSE	Après déduction DU LÉVULOSE initial « Inulides »
Levure a . .	0,96	1,92	—
Levure A . .	8,368	16,736	11,736
Levure B . .	9,40	18,800	13,800
Levure C . .	10,64	21,28	16,28

Ainsi, à chacune de ces races successives de levure correspond une augmentation d' « inulides » fermentescibles, sauf pour la levure apiculée, qui ne les attaque pas.

Déterminons ces trois groupes d' « inulides » α, β, γ correspondant au travail des levures A, B, C, en ramenant nos résultats à 100 grammes d'hydrates de carbone.

LEVURES EMPLOYÉES	ALCOOL EN POIDS	LÉVULOSE CORRESPONDANT	LÉVULOSE INITIAL DÉDUIT (19,8)
A	33,2	66,4	46,6
B	37,3	74,6	54,8
C	42,2	84,4	64,8

Ce qui fait, sur 100 grammes de matières hydrocarbonées initiales :

En « inulides » α. 46.6
En « inulides » β. 8,2
En « inulides » γ. . . . . 10 »

Ensemble : $\alpha + \beta + \gamma =$ 64,8

C'est-à-dire qu'avec les levures B et C on attaque respectivement 8,2 et 18,20 de matière de plus qu'avec la levure A.

(1) Levure isolée par M. Fiquet, à Hanoï, en 1902; Will s'est attribué, à tort, la paternité de cette découverte.

On pourrait nous objecter que l'augmentation d'alcool provient simplement d'une différence d'activité des levures, qu'il n'y a pas lieu d'en déduire l'existence de plusieurs « inulides ».

Or nous avons observé que la fermentation terminée après 24 heures avec la levure B était à peine commencée avec le Schizosaccharomyces Pombe, alors que cette dernière levure pousse la fermentation plus loin. D'ailleurs, il est démontré que le Schizosaccharomyces Pombe attaque des dextrines sur lesquelles d'autres levures n'ont aucune action. Si nous admettons ainsi l'existence de plusieurs dextrines, il n'y a pas de raison pour rejeter *a priori* la formation de plusieurs « inulides ».

D'autre part, M. A. Fernbach (1) semble admettre l'existence de plusieurs sucrases.

MM. Lintner et Eckhardt (2), en étudiant comparativement les amylases de l'orge et du malt, ont pu déterminer les caractères spécifiques de chacune d'elles. MM. Maquenne et Roux (3) montrent que l'amylase de l'extrait de malt abandonné à lui-même pendant 8 à 10 jours, à l'abri de toute cause d'altération, subit une augmentation d'activité vis-à-vis des dextrines les plus résistantes.

D'après les expériences de MM. Fernbach et Wolff (4), l'amylase de l'orge ne transforme que 75 p. 100 de l'amidon en maltose, à la température de 45°, alors que l'amylase du malt pousse la transformation jusqu'à 100 p. 100. Tout récemment, M. Effront (5) (à la suite de travaux avec M. Boidin sur un bacille liquéfiant) a découvert une amylase très spéciale, n'attaquant l'amidon et ses produits de dégradation que jusqu'au terme *achroodextrine*. (Il reste 60 p. 100 des dextrines non attaquées.) Il y a donc un parallélisme étroit entre les phénomènes diastasiques observés par nous sur les « inulides » et ceux étudiés sur les dextrines par les auteurs cités.

(1) Fernbach, *Thèse*, *loc. cit.*

(2) *Journal für prakt. Chem.*, 41, 41, 1890.

(3) Maquenne et Roux, Sur quelques propriétés nouvelles de l'extrait de malt, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 142, p. 1387.

(4) Fernbach et Wolff, Sur l'inégalité de résistance de l'amidon naturel et de l'amylose artificielle vis-à-vis de l'extrait d'orge. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 144, 1907.

(5) Effront, Sur l'achroodextrinase, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 164, p. 415, 1917.

ANALOGIE ENTRE LA DIASTASE SACCHARIFIANTE DU SUC DE CHICORÉE ET LA SUCRASE DE LA LEVURE

Nos expériences ont établi qu'il existe dans le suc de chicorée une « diastase saccharifiant » les « inulides ». D'autre part, ainsi que M. Guillot (1), nous avons pu prouver dans ce suc l'existence d'une diastase inversive du saccharose (la sucrase).

En présence de ces faits, il devenait intéressant de s'assurer si l'extrait de levure agirait aussi sur les « inulides » pour les transformer en sucres réducteurs. Dans ce but, nous avons entrepris d'autres expériences à l'aide d'un extrait de levure fraîche pressée. La levure, broyée avec du sable fin lavé, a été laissée en contact avec de l'eau pendant 1/2 heure. Après avoir filtré à la trompe, on a divisé l'extrait en deux parties égales, dont l'une fut chauffée à l'ébullition pour détruire les diastases.

Nous avons ensuite, avec cette solution d'extrait de levure bouilli et non bouilli, fait les préparations suivantes :

I	Suc de chicorée à 50 p. 100.	25 c.c.
	Extrait de levure	5 c.c.
I *bis* . . .	*Id.*, avec extrait bouilli de levure.	
II.	Suc de chicorée à 50 p. 100, additionné de 1/1.000 d'acide acétique normal.	25 c.c.
	Extrait de levure	5 c.c.
II *bis*. . .	*Id.*, avec extrait bouilli de levure.	
III	Suc de chicorée à 50 p. 100, additionné de 1/100 d'acide acétique normal	25 c.c.
	Extrait de levure.	5 c.c.
III *bis* . .	*Id.*, avec extrait bouilli de levure.	
IV	Solution de saccharose à 5 p. 100.	25 c.c.
IV *bis* . .	*Id.*, avec extrait bouilli de levure	5 c.c.
V.	Solution d'inuline à 2,5 p. 100	20 c.c.
	Extrait de levure	10 c.c.

Toutes ces préparations ont été maintenues 20 heures au bain-marie, réglé à 50°; puis, après refroidissement et défécation à l'acétate de plomb, le sucre réducteur fut dosé.

(1) Guillot (Camille). La Chicorée et divers produits de substitution du café, *Thèse de pharmacie*, 1911.

		SUCRE dosé (pour 100 c.c. de suc ou de solution sucrée)	SUCRE produit par l'extrait de levure (pour 100 c.c. de suc ou de solution sucrée)
I . . .	Suc non acidifié	8 gr. 40	5 gr. 20
I *bis*. .	(Témoin).	3 gr. 20	
II. . .	Suc acidifié à 1 p. 1.000 . . .	10 gr. 20	6 gr. 80
II *bis* .	(Témoin)	3 gr. 40	
III . .	Suc acidifié à 1 p. 100	8 gr. 80	4 gr. 70
III *bis*.	(Témoin)	4 gr. 10	
IV . .	Solution de saccharose à 5 p. 100	4 gr. 50	4 gr. 50
IV *bis*.	(Témoin)	Traces	
V . . .	Solution d'inuline pure		Néant
	d° après 24 heures.		Néant
	d° après 48 heures.		Néant
	d° après 15 jours		Néant

Les résultats sont très nets. Il existe dans l'extrait de levure une diastase saccharifiant les « inulides » et n'attaquant pas l'inuline. Le même extrait renferme incontestablement de la sucrase, puisqu'il intervertit le saccharose.

D'autre part, nous avons vu que la levure apiculée ne renfermant pas de sucrase était sans action sur les « inulides ». Il y a donc de très fortes présomptions en faveur de l'hypothèse que la sucrase et la diastase hydrolysant les inulides ne fassent qu'une seule et même substance.

INACTIVITÉ DES LEVURES ET DU SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE SUR L'INULINE PURE

Nous avons expérimenté sur des inulines commerciales d'origine française et allemande, sur de l'inuline pure préparée par M. Legroux et sur une inuline préparée et purifiée par nous-mêmes. Les expériences devant être prolongées pendant une dizaine de jours, les solutions d'inuline ont été stérilisées pendant un quart d'heure à 120°, afin d'éliminer toute cause d'erreur pouvant provenir de la présence de micro-organismes, résistant à une température inférieure et pouvant influencer la production d'alcool.

Le tableau suivant résume les résultats; il indique le volume d'alcool produit par la fermentation de 1 gramme d'inuline de diverses provenances sous l'action des levures Pombe, A et B ensemencées aseptiquement après chauffage à 120° et refroidissement des solutions.

1 GRAMME D'INULINE en solution dans 25 c. c. d'eau de levure stérilisée à 120°	LEVURES employées	ALCOOL en volume pour 1 gramme D'INULINE	ALCOOL EN VOLUME pour 1 gramme D'INULINE déduction faite de la faible quantité d'alcool des témoins
Eau de levure (témoin) . .	S. Pombe	0 c.c. 00725	—
Solution d'inuline pure du dahlia (1)	S. Pombe	0 00725	0
Solution d'inuline pure de chicorée (2)			0
Solution d'inuline du commerce français	Levure A	0 00725	—
	Levure B	0 00820	0,00105
	Levure Pombe (C).	0 045	0,03475
Solution d'inuline de Draggendorf	Levure A	0 058	0,0507
	Levure B	0 083	0,0757
	Levure Pombe (C).	0 310	0,30275

(1) Préparée par M. Legroux.
(2) Préparée par les auteurs.

Ce tableau indique tout d'abord que l'inuline pure, contrairement aux affirmations de certains auteurs, n'est pas attaquée par le Schizosaccharomyces Pombe, fait permettant de reconnaître la pureté d'une inuline; il montre ensuite que l'inuline de Draggendorf contient des inulides en notable proportion.

D'ailleurs les levures A, B et Pombe se comportent vis-à-vis de ces « inulides » comme elles se sont comportées vis-à-vis des « inulides » du suc de chicorée, confirmant ainsi nos observations précédentes, qu'à chaque levure correspond une quantité différente de matière transformée.

En résumé :

1° L'inuline pure ne fermente ni par les levures essayées, ni par le Schizosaccharomyces Pombe;

2° L'inuline pure n'est pas attaquée par les diastases saccharifiantes sécrétées par les diverses levures (sucrase ou autres);

3° Les produits de dégradation de l'inuline fermentent par les levures;

4° Les mêmes produits sont attaqués par les diastases hydrolysantes des levures qui, vis-à-vis des « inulides », deviennent des diastases saccharifiantes;

5° Les levures qui attaquent le saccharose attaquent également les « inulides »;

6° Les levures ne renfermant pas de sucrase (comme la levure apiculée du raisin) n'attaquent pas plus les « inulides » que le saccharose.

APPENDICE

Méthode L. Martin (1)

POUR LE DOSAGE DE PETITES QUANTITÉS D'ALCOOL.

Le principe de la méthode repose sur l'oxydation de l'alcool au moyen d'une liqueur de bichromate de potassium en solution sulfurique.

On sait que 2 molécules de bichromate de potassium oxydent 3 molécules d'alcool.

2 ($K^2Cr^2O^7$)	oxydent	3 (C^2H^5OH)
588	correspond à	138
42,6087	correspond à	10

Pour faciliter les calculs, on a établi une liqueur de bichromate, dont 1 cent. cube oxyde 0 gr. 01 d'alcool.

On fera donc une solution de bichromate de potassium contenant très exactement par litre 42 gr. 6087 de ce sel. Cette solution servira à titrer la solution suivante :

Sulfate de fer ammoniacal	92 grammes.
Acide sulfurique	10 grammes.
Fil de clavecin	0 gr. 01
Eau distillée q. s. pour	1.000 c. c.

Dans un verre à expérience de 500 cent. cubes, on mesure 20 cent. cubes de solution de bichromate additionnée de 10 cent.

(1) *Moniteur de Quesneville*, t. II, p. 570, 1903.

cubes d'acide sulfurique pur; on étend à 400 cent. cubes avec de l'eau distillée et on y fait couler, d'abord rapidement, puis de 0 c. c. 2 en 0 c. c. 2, la solution de sulfate ferreux jusqu'à ce qu'une goutte de mélange prélevée avec une baguette de verre donne une coloration bleue avec une solution très étendue de ferricyanure de potassium (méthode à la touche). On note la correspondance des liqueurs. Soit N cent. cubes de solution de sulfate de fer employée pour 20 cent. cubes de solution de bichromate. 1 cent. cube de solution de bichromate correspond à $\frac{N}{20} = q$ c.c. de solution de sulfate de fer.

Dosage de l'alcool.

Pour doser de petites quantités d'alcool par ce procédé, on prélève 10 cent. cubes de la solution à analyser (1), qu'on verse dans un ballon de 50 cent. cubes et on distille à feu nu les 7/10 de la solution, que l'on recueille dans 20 cent. cubes de liqueur de bichromate de potassium, au titre ci-dessus, additionné de 10 cent. cubes d'acide sulfurique. On fait le dosage comme précédemment avec la solution de sulfate de fer. Soit N′ le nombre de cent. cubes employés.

$\frac{N'}{q}$ correspond à la quantité de bichromate restant et $20 - \frac{N'}{q} = P$ représente le volume de bichromate utilisé par l'oxydation de l'alcool recueilli.

Or 1 c.c. de bichromate représente 0 gr. 01 ou 0 c.c. 0126 d'alcool; donc P représente

$$P \times 0 \text{ gr. } 01 \text{ d'alcool,}$$
ou
$$P \times 0 \text{ c.c. } 0126 \text{ d'alcool.}$$

En multipliant les résultats trouvés par 100, on a le poids ou le volume d'alcool dans 100 cent. cubes de liquide examiné. Un simple calcul suffira pour ramener au volume initial.

(1) Il faut procéder à la distillation sur des liqueurs très étendues, 1,5 à 2 p. 100 d'alcool au maximum.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

32e ANNÉE MARS 1918 N° 3

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

GLANDES SURRÉNALES ET TOXI-INFECTIONS

par A. MARIE.

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

En terminant notre premier mémoire (1) sur les recherches qui nous avaient permis de découvrir le pouvoir neutralisant exercé par l'adrénaline sur les toxines bactériennes solubles (2), nous rappelions que les accidents d'asthénie cardiaque, si fréquents dans certaines maladies infectieuses (diphtérie, tétanos, fièvres éruptives, fièvre typhoïde, etc.), étaient attribués aujourd'hui à une insuffisance de la fonction adrénalinique des capsules et à l'affaiblissement consécutif du système cardio-vasculaire. Ainsi, on connaît des observations nombreuses de diphtérie (syndrome cardio-gastrique de la diphtérie, Sevestre) où l'adynamie cardiaque ne peut être expliquée par des lésions du myocarde et, comme d'autre part l'expérimentation a montré qu'une injection de toxine s'accompagne d'une chute énorme de la pression sanguine (Hallion, Enriquez), on a attribué la mort rapide dans les toxi-infections à une défaillance du système chromaffine des surrénales, dans lesquelles Roux et Yersin avaient déjà noté, consécutivement à la diphtérie, des

(1) Ces *Annales*, t. XXVII, p. 294.

(2) Nous avons montré plus tard que l'adrénaline neutralise aussi les toxines végétales, abrine, ricine. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1915, p. 330.

lésions dont Pettit devait faire plus tard l'étude histologique.

Dans ces nouvelles recherches sur l'adrénaline chez des animaux soumis à l'action des toxines solubles, l'impossibilité de nous procurer suffisamment de cobayes, animaux de choix pour l'étude de la toxine diphtérique, a limité pour un temps nos expériences à la toxine tétanique (1), laquelle, d'ailleurs, constitue un test d'une valeur inappréciable. Mais avant de passer à l'étude expérimentale de l'adrénaline *in vivo*, il nous faut revenir sur l'action neutralisante exercée par cet alcaloïde.

Elle a été confirmée, plus d'un an après nos premières recherches, par deux Russes, S. Abramow et S. Mischennikow (2), dans un travail dont les résultats expérimentaux sont pleinement d'accord avec les nôtres. Ils montrent aussi que les mélanges adrénaline-toxine diphtérique (ou tétanique) sont inoffensifs en injection intraveineuse à la condition, précisée par nous, d'avoir été exposés à 37°. Toutefois, l'explication proposée par Abramow et Mischennikow de l'action neutralisante est pour le moins étrange, puisqu'ils concluent que le pouvoir antitoxique de l'alcaloïde n'est pas d'ordre chimique et qu'il « appartient plutôt au type des réactions colloïdales, en ce sens que les molécules de toxine se précipitent par suite de leur contact avec un autre colloïde (*sic*), l'adrénaline ». Or nos recherches sur le pouvoir antitoxique de ce *cristalloïde* qu'est l'adrénaline, sous ses formes racémique, droite, gauche, ont montré que son action sur les toxines est bien d'ordre chimique et que les solutions de ses sels, toutes également neutres, ont présenté une activité comparable sur les toxines diphtérique et tétanique.

Une telle action neutralisante s'exerce toujours suivant certaines proportions des deux corps en présence, ce dont voici un exemple.

La dose mortelle d'une toxine diphtérique pour la souris, espèce particulièrement résistante, étant 0 c.c. 50, on l'injecte, mélangée avec la quantité maxima de chlorhydrate

(1) La toxine très active, dont nous nous sommes servi, nous a été obligeamment livrée par le Service de Sérothérapie de l'Institut Pasteur.
(2) *Zeits. für Immunitätsf. und exper. Ther.*, I, Orig., t. XX, p. 253.

d'adrénaline supportée par une souris de 15 grammes, soit 0 gr. 00015; quatre jours après, l'animal présente un début de paralysie diphtérique, en même temps que le témoin. Ainsi, tandis que chez le cobaye nous avons vu (1) la vingtième partie de la quantité d'adrénaline qu'il peut tolérer suffire à neutraliser 5 à 6 doses mortelles de toxine diphtérique, ce nouveau fait montre qu'une simple dose de celle-ci n'a pu être neutralisée chez la souris; par conséquent, cette neutralisation de la toxine par l'adrénaline exige certaines proportions des deux substances en présence, elle est bien d'ordre chimique. Faisons remarquer, toutefois, que nous ignorons le mécanisme qui préside à cette neutralisation : en effet, nous ne sommes pas en état de dire si l'alcaloïde des capsules, en plus de son action chimique, agit par lui-même, ou bien comme hormone (2), en provoquant la sécrétion d'une substance dans l'organisme, et cela puisque le seul critère de tout mode de neutralisation des propriétés toxiques dans les deux cas ne saurait être que d'ordre biologique.

En 1915, a paru un travail d'un Allemand, M. J. Stutzer (3), sur l'*action de l'adrénaline vis-à-vis des bactéries et de la toxine diphtérique*. On y relève les particularités suivantes. Les solutions de sels d'adrénaline qu'il a essayées étaient d'une acidité énorme puisqu'elles contenaient 0,0365 p. 100 d'HCl libre, dose déjà suffisante pour altérer toutes sortes de produits microbiens. Quant à l'adrénaline-base dont il s'est également servi, elle se dissolvait dans 1.000 parties d'eau, chose tout à fait extraordinaire, cette substance n'étant soluble que dans cinq fois plus de liquide (1 p. 5.000), circonstance qui limite d'ailleurs l'emploi de cette forme de l'alcaloïde, laquelle possède cependant un pouvoir neutralisant comparable à celui des sels d'adrénaline.

Une des questions les plus importantes dans l'action de l'adré-

(1) Ces *Annales*, *loc. cit.*

(2) Nous rappellerons que le terme d'hormone (ὁρμάω, j'excite) a été proposé par W. B. Hardy à la suite de la découverte de la sécrétine (1902). Mais déjà en 1891, on trouve dans les travaux de Brown-Séquard cette conception d'après laquelle des sécrétions peuvent influer, par voie sanguine, d'autres cellules rendues ainsi solidaires les unes des autres grâce à un mécanisme autre que celui du système nerveux : les hormones sont des intermédiaires, des agents de liaison.

(3) *Zeits. für Immunitätsf. und exper. Ther.*, I; Orig., t. XXII, p. 372.

naline sur les toxines bactériennes solubles est la suivante : cet alcaloïde, qui neutralise leur pouvoir toxique, détruit-il leurs propriétés antigènes?

I. — ADRÉNALINE ET ANTIGÈNE

Il paraît presque superflu de rappeler les nombreux exemples de poisons bactériens dont le pouvoir toxique ne va pas de pair avec celui d'antigène : les solutions des toxines solubles devenues complètement atoxiques, celles qu'on désigne sous le nom de toxoïdes, ont conservé leur propriété de donner naissance à des anticorps. Des agents chimiques, tels que la formaline, le sulfure de carbone, des composés iodés, etc., peuvent modifier complètement une toxine sans lui enlever ses caractères d'antigène, et il serait vain d'ajouter à cette liste l'adrénaline s'il ne s'agissait là d'une sécrétion normale de l'organisme. Mais précisément, en raison de cette circonstance, il devient tout à fait important de montrer que dans l'organisme les propriétés d'antigène de la tétanine sont conservées au contact de cet alcaloïde, que les veines capsulaires déversent dans la circulation (1) suivant un rythme réglé par le système sympathique.

* * *

Expérience I.

On soumet sept lapins vigoureux à des injections répétées, sous la peau, de mélanges exposés à 37°, et dans lesquels la quantité de chlorhydrate neutre d'adrénaline est plus que suffisante pour neutraliser le pouvoir toxique d'une quantité donnée de toxine tétanique, ce dont on s'assure par leur injection à des souris; ensuite, les lapins sont saignés partiellement avant d'être éprouvés par l'inoculation de toxine pure dans les muscles d'une des cuisses postérieures (tableau 1).

(1) Les physiologistes estiment que, chez l'homme, la totalité du sang ne renferme pas au delà de 4 milligr. d'adrénaline à l'état normal.

TABLEAU 1. — **Immunisation du lapin par des mélanges toxine-adrénaline.**

20 novembre	27	4 décembre	11	18	23	31	5 janvier	14	15	16	18	22	23	25	28
Lapins.								Épreuve sous-cutanée p. la tox. tét.							
12 (2940).	3130	3240	3230	3350	3300	3450	3410	0 c. c. 05	0	0	+				
13 (3140).	3200	3300	3270	3100	3180	3120	3120	0 c. c. 05	0	0	0	0	0	0	0
14 (2780).	3000	2990	2980	2900	2880	2900	2920	0 c. c. 05	0	0	0	0	0	0	0
15 (2980).	3260	3070	3080	3030	2960	2970	2980	0 c. c. 05	0	0	0	0	0	0	0
16 (3330).	3540	3610	3610	3230	3390	3320	3320	0 c. c. 05	0	0	0	0	0	0	0
17 (2750).	3000	2920	3100	2650	2610	2710	2710	0 c. c. 08	0	0	0	0	0	0	0
18 (2590).	2530	2470	2540	2520	2350	2330	2410	0 c. c. 10	0	0	—		—	—	—
TT. 0 c.c. 0001.	0,0001	0,0003	0,0003	0,0009	0,0009	0,0009	0,0001								
Adr. 0 gr. 00015.	0,00015	0,0004	0,0004	0,0001	0,0001	0,0001	0,0005								
Témoins 19 (2.940).	....	....	....	....	....	....	....	0 c. c. 05	0	0	=	=	=	+	
Témoins 20 (3.200).	....	....	....	....	....	....	....	0 c. c. 05	0	0	—		+		

Le sérum de ces lapins n'avait aucun pouvoir antitoxique appréciable, mais ce tableau montre qu'il a suffi d'une quantité totale *très faible* de toxine surneutralisée par l'adrénaline pour assurer l'immunité à cinq lapins contre une dose mortelle, le sixième ayant présenté un tétanos local avec une dose double de tétanine. Donc l'alcaloïde des surrénales ne détruit pas les propriétés vaccinantes de la toxine, tout en neutralisant ses propriétés toxiques, vraisemblablement suivant un processus d'oxydation.

Toutefois, il était indispensable de rechercher si de telles vaccinations pouvaient faire apparaître des anticorps dans le sérum des animaux, en un mot si les principaux caractères d'un antigène se trouvaient conservés dans une toxine traitée par l'adrénaline.

Pour cela, il était indiqué de s'adresser à des mammifères très petits et d'injecter des doses plus fortes d'antigène-adrénaline, après s'être débarrassé de l'excès de cet alcaloïde, extrêmement toxique. Nous allons voir que le procédé de la dialyse, qui paraît tout d'abord convenir, ne suffit pas, mais nous a montré que la toxine tétanique neutralisée par l'adrénaline présente une propriété nouvelle et très intéressante, celle de passer à travers les membranes dialysantes en collodion. On sait, en effet, que Manea, Baroni (1), ont montré que la plus petite trace de toxine tétanique ne traverse pas les dialyseurs à base de nitro-cellulose, même sous pression, tandis que la toxine diphtérique passe en partie à travers de telles membranes.

Expérience II.

Trois sacs en collodion (à 3 p. 100 de fulmicoton), montés à l'extrémité d'un tube en verre et plongeant chacun dans un flacon d'eau distillée sont remplis de 30 cent. cubes, le premier de toxine tétanique pure, le deuxième de toxine incomplètement neutralisée par du chlorhydrate d'adrénaline, le troisième d'un mélange tout à fait neutralisé. Après 48 heures de séjour à la glacière, on recueille séparément chacun des six liquides que

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 4 mars 1911.

l'on additionne à saturation de sulfate d'ammoniaque chimiquement pur. Les précipités, desséchés sous le vide sulfurique, sont inoculés à doses convenables sous la peau de la patte à des souris; les liquides ne précipitant pas ont été injectés avant leur saturation par le sel (tableau 2).

Tableau 2. — **Dialyse de mélanges toxine-adrénaline.**

APPAREILS DIALYSEURS		SULFATE D'AMMONIAQUE	INJECTION
Dialyseur n° 1 (toxine pure). . .	Liq. ext.	Aucun précipité.	Rien.
	Liq. int.	Précipité.	Tétanos.
Dialyseur n° 2 (toxine partiellement neutralisée).	Liq. ext.	Précipité (1).	Rien.
	Liq. int.	Précipité.	Tétanos.
Dialyseur n° 3 (toxine tout à fait neutralisée). .	Liq. ext.	Précipité.	Rien.
	Liq. int.	Aucun précipité.	Rien.

(1) Les précipités mettent plusieurs heures à se faire.

Plus la toxine tétanique approche de sa neutralisation complète par l'adrénaline et plus elle tend à passer en totalité à travers les dialyseurs de collodion. Le deuxième, chargé d'une toxine partiellement neutralisée, nous présente le phénomène d'une façon saisissante : des deux côtés de la membrane de nitro-cellulose, l'un et l'autre liquide précipitent également bien par le sulfate d'ammoniaque, mais tandis que le précipité apparu dans le liquide intérieur donne un tétanos violent, celui du liquide extérieur ne produit aucun trouble apparent chez les animaux; par contre, il possède la propriété précieuse de les immuniser et de développer dans leurs humeurs le pouvoir antitoxique et le pouvoir préventif.

Expérience III.

Les précipités recueillis dans les liquides extérieurs des dialyseurs 2 et 3 de l'expérience précédente, puis desséchés sous le vide sulfurique, servent à préparer dans l'eau *distillée* une solu-

tion que l'on filtre à travers une bougie Chamberland, et qui est utilisée pour le traitement des animaux. En tout, 0 gr. 85 de précipité ont été dissous dans 105 cent. cubes d'eau, ce qui a donné après filtration 85 cent. cubes (tableau 3).

TABLEAU 3. — **Immunisation de souris par l'antigène adrénaliné.**

ANIMAUX ET DOSES D'ANTIGÈNE	ÉPREUVE	TOXINE	1	2	3	4	5	6	7
1. Souris : 4 c.c. 10, en 5 séances	Ve jour.	0 c.c. 000001	0	0	0	0	0	0	0
2. Souris : . . . . . . (4 c.c. en 5 séances.)	VIIe jour.	0 c.c. 00001	=	+					
3. Souris : . . . . . . (4 c.c. en 5 séances.)	VIIe jour.	0 c.c. 00001	0	=	+				
4. Souris : 4 c.c. 70, en 7 séances	IIIe jour.	0 c.c. 00001	=	=	=	=	=	=	+
5. Souris : 6 c.c. 40, en 8 séances	VIIe jour.	0 c.c. 000001	0	0	0	0	0	0	0
6. Souris : . . . . . . (10 c.c. 70, en 11 séances.)	Ve jour.	0 c.c. 00001	0	0	0	0	0	0	0
7. Souri : . . . . . . (10 c.c. 70, en 11 séances.)	Ve jour.	0 c.c. 00001	0	0	0	0	0	0	0
8. Souris : 10 c.c. 70, en 11 séances.	Ve jour.	0 c.c. 00001	0	0	0	0	0	0	0
9. Souris : . . . . . . (10 c.c. 70, en 11 séances.)	Ve jour (saignée).								
10. Souris : . . . . . . (10 c.c. 70, en 11 séances.)	Ve jour (saignée).								
11. Souris : . . . . . . (Témoins.)	. . . . . .	0 c.c. 000001	=	=	+				
12. Souris : . . . . . . (Témoins.)	. . . . . .	0 c.c. 000001	-	=	+				
13. Souris : . . . . . . (Témoins.)	. . . . . .	0 c.c. 000001	=	=	+				
14. Souris : . . . . . . (Témoins.)	. . . . . .	0 c.c. 000001	=	=	+				

Des souris, d'un poids moyen de 16 grammes, ont reçu de ce filtrat sous la peau : 5 des quantités variant de 4 à 6 cent. cubes en 5-15 jours, 5 de 2 à 10 cent. cubes en 3 semaines environ, sans présenter autre chose que de légères eschares, apparues vers le milieu des 6-11 séances d'inoculations. Un seul animal est mort au cours du traitement.

L'épreuve était faite à des dates variables après l'injection dernière.

Tableau 4. — **Pouvoirs antitoxique et préventif du sang.**

INJECTIONS DU SANG DES SOURIS 9 ET 10 DU TABLEAU 3	1	2	3	4	5	6	7
Pouvoir antitoxique.							
1. Souris : 0 c.c. 25 sang de souris 9 + 0 c.c. 00001 toxine	0	0	0	0	0	0	0
2. Souris : 0 c.c. 20 sang de souris 10 + 0 c.c. 00001 toxine	0	0	0	0	0	0	0
Pouvoir préventif.							
3. Souris : 0 c.c. 50 sang de souris 9.	0 c.c. 00001 de toxine.	0	0	0	0	0	0
4. Souris : 0 c.c. 25 sang de souris 10.	0 c.c. 00001 de toxine.	0	0	0	0	0	0
Témoins.							
5. Souris : 0 c.c 50 de sang neuf + 0 c.c. 000001 toxine	—	=	=	=	[illegible]	=	+
6. Souris : 0 c.c. 40 sang de souris neuve.	0 c.c. 000001 de toxine.	=	=	+			
7. Souris : 0 c.c. 50. Antigène adrénaliné + 0 c.c. 000001 toxine	—	=	=	=	=	+	

Dans les essais d'immunisation chez le lapin, la quantité d'antigène administrée, nous insistons là-dessus, a toujours été *très petite* de même que chez la souris, dont la teneur du sang en anticorps s'est montrée assez faible, puisque nous voyons le sang neutraliser seulement quelque dix doses mortelles de toxine (1). Mais si ces faits sont d'une certaine importance, elle est surtout d'ordre théorique, et nous attirons l'attention en particulier sur le pouvoir préventif des humeurs chez les souris, celui qui donne, selon nous, sa vraie caractéristique à l'immunisation active par un antigène bactérien.

Dans la préparation de celui dont nous étudions les propriétés, il entre nécessairement une certaine quantité de l'adrénaline employée pour la neutralisation de la toxine. En effet, l'alcaloïde dialyse d'abord dans le liquide extérieur qu'il colore en rose, et qui ne se charge que lentement de la toxine neutralisée; mais l'addition de sulfate d'ammoniaque a pour effet

(1) L'action toxique, locale et générale de l'adrénaline à doses répétées crée un obstacle à la poursuite des vaccinations.

de précipiter l'adrénaline en même temps que le poison microbien, ainsi qu'il est facile de s'en assurer en traitant une solution d'un sel neutre d'adrénaline ou d'adrénaline-base par du sulfate d'ammoniaque à saturation. Notre antigène tétanique est donc un précipité mixte (1) d'adrénaline et de toxine neutralisée par elle, et les animaux inoculés avec une solution de ce précipité mixte peuvent succomber aux accidents de l'empoisonnement par l'adrénaline. Est-il besoin d'ajouter que le traitement, quelque temps poursuivi par des doses croissantes de cet alcaloïde employé seul, a pour effet une accoutumance faible à ce poison, sans augmenter en rien la résistance naturelle de l'organisme à l'action de la toxine tétanique?

II. — ADRÉNALINE ET INTOXICATION TÉTANIQUE

Dans notre premier mémoire, nous avons vu que l'administration sous-cutanée de l'adrénaline n'a aucune action préventive contre une intoxication tétanique : toutes les fois que l'alcaloïde et la toxine sont injectés séparément sous la peau, ils restent inactifs vis-à-vis l'un de l'autre, leurs mélanges seuls exposés à 37° assurant l'innocuité de la toxine dans des conditions déterminées par nous.

L'expérience suivante fournit une nouvelle preuve de l'inactivité de l'adrénaline administrée dans ces conditions.

*
* *

Expérience IV.

On injecte sous la peau dans la patte postérieure d'une souris 0 gr. 0002 de chlorhydrate d'adrénaline dissous dans 0 c.c. 25 d'eau physiologique, après quoi, sans retirer l'aiguille on y adapte une autre seringue chargée de 0 c.c. 0001 de toxine diluée dans 0 c.c. 25 d'eau physiologique. On a exposé d'autre part à 37° les deux mêmes dilutions mélangées ensemble.

(1) Aux doses employées pour l'inoculation des animaux, l'action du sulfate d'ammoniaque cristallisé est pratiquement négligeable dans ce précipité, qui contient en outre les albumoses et les sels du bouillon tétanique.

Tableau 5. — **Inefficacité de l'adrénaline** *in vivo.*

ANIMAUX	1	2	3	4	5	6	7
1. Souris : 0 gr. 0002 chl. d'adr., ensuite 0 c.c. 0001 de toxine	—	=	=	+			
2. Souris : Les deux substances mélangées (37°).	0	0	0	0	0	0	0
3. Souris : Toxine, 0 c.c. 0001	—	=	+				

Cette expérience et d'autres analogues, ou répétées avec des variantes, montrent que jamais on ne peut constater la moindre action préventive de l'adrénaline inoculée sous la peau des animaux, comme si la constriction des vaisseaux locaux empêchait l'absorption de l'alcaloïde et arrêtait son action. Chez les animaux surtout, on sait, en effet, que son administration sous-cutanée provoque très incomplètement l'élévation de la pression sanguine, l'adrénaline pouvant subir sur place une oxydation suffisante pour lui faire perdre jusqu'à 94 p. 100 de son activité physiologique (1). Mais, si les animaux inoculés de la sorte n'échappent jamais à l'intoxication tétanique, il n'en reste pas moins que l'adrénaline injectée à haute dose, voisine de la dose mortelle, n'est pas sans action sur la toxine, puisqu'on voit celle-ci disparaître dans le sang. Cette recherche doit nécessairement être faite chez de petits animaux.

Expérience V.

Des souris reçoivent sous la peau, ou bien dans le sang, une dose convenable d'adrénaline et, un certain nombre de minutes ou d'heures après, quelques millièmes de cent. cube de tétanine sous la peau; d'autres souris reçoivent la toxine seule. A des temps variables, les unes et les autres sont sacrifiées et leur sang est injecté à d'autres souris.

(1) Chez des animaux tels que le chien, le lapin, le cobaye, la dose mortelle, par kilogramme d'animal, de chlorhydrate d'adrénaline présente des écarts considérables, de 1 à 100, suivant que l'injection est faite dans les veines ou sous la peau. Chose inattendue, le cerveau supporte bien les injections d'adrénaline : la même dose, mortelle par la voie veineuse, est inoffensive par trépanation.

Tableau 6. — **Disparition de la toxine dans le sang.**

INJECTIONS — DE L'ADRÉNALINE ET DE TOXINE	INJECTIONS — DU SANG	1	2	3	4	5	6	7
1. Souris : 0 gr. 00007 de chlor. adr. P.G.P. et 2 heures après 0 c.c. 0001 toxine tétanique P.D.P.	15 minutes après la toxine. injection de la totalité du sang de 1 à une souris neuve.	0	—	—	—	=	=	=
2. Souris : reçoit seulement 0 c.c. 0001 toxine.	15 min. après.	=	≡	≣	+			
3. Souris : 0 gr. 00007 chlor. adr. P.G.P. et 15 heures après 0 c.c. 000016 toxine P.D.P.	30 min. après	0	0	0	0	0	0	0
4. Souris : seulement 0 c.c. 000016 toxine.	30 min. après.	—	=	=	=	=	=	=
5. Souris : 0 gr. 0001 chlor. adr. P.G.P. et 5 heures après 0 c.c. 01 toxine P.D.P.	5 min. après.	0	0	0	0	0	0	0
6. Souris : 0 c.c. 01 toxine seule.	5 min. après.	0	=	≡	≣	+		
7. Souris : 0 gr. 0001 chlor. adr. P.G.P. et 1 h. 30 après 0 c.c. 01 toxine P.D.P.	5 min. après.	0	0	0	0	0	0	0
8. Souris : 0 gr. 00007 adr.-base dans la veine (1) et 5 minutes après 0 c.c. toxine P.G.P.	4 h. après.	0	0	0	0	0	0	0
9. Souris : 0 gr. 00007 adr.-base dans la veine et 5 minutes après 0 c.c 01 toxine P.G.P.	Non sacrifiée.	=	≡	+				
10. Souris : 0 c.c. 01 toxine.	Non sacrifiée.	≡	+					

(1) Nous rappellerons que l'injection dans l'une des veines latérales de la queue ne doit pas dépasser le volume d'un tiers de cent. cube, qu'on poussera très lentement en introduisant dans le vaisseau seulement la pointe de l'aiguille, très fine et non rugueuse.

Ainsi, l'adrénaline impuissante, après son introduction dans le tissu cellulaire, à empêcher l'intoxication par la tétanine, a cependant déterminé, directement ou *indirectement* (souris 1, 3, 5, 7), sa disparition dans le sang. En outre, nous trouvons dans le fait d'un tétanos survenu malgré cette disparition, une preuve nouvelle de l'absorption directe du poison par les expansions nerveuses, qui ont pu le puiser dans la lymphe de la zone d'inoculation où il reste longtemps à une concentration beaucoup plus élevée que dans le sang (1).

(1) Ces *Annales*; t. XVI, p. 818.

Chez le cobaye et le lapin, l'injection intraveineuse d'adrénaline suffit, dans certaines conditions, à prévenir le tétanos.

TABLEAU 7. — **Action préventive de l'adrénaline.**

ANIMAUX	POIDS	PREMIÈRE INJECTION INTRAVEINEUSE	DEUXIÈME INJECTION INTRAVEINEUSE	RÉSULTATS
Cobaye 50	470	0 c.c. 0001 TT., jugulaire.	»	Tétanos.
Cobaye 51	480	0 c.c. 05 chl. adr., 1 p. 1.000, jugulaire.	5 min. après, 0 c.c. 001 TT. même jugul.	∞
Cobaye 52	370	0 c.c. 02 chl. adrén., jugulaire.	5 min. après, 0 c.c. 0005 TT. dans l'autre jug.	Tétanos.
Cobaye 74	600	0 c.c. 04 chl. adrén., jugulaire.	0 c.c. 0001 TT., même jugulaire.	∞
Cobaye 79	395	0 c.c. 025 chl. adrén., jugulaire.	0 c.c. 0001 TT. autre jugulaire.	Tétanos.
Lapin 81	2400	0 c.c. 30 chl. adrén., veine auriculaire.	2 c.c. TT. autre veine.	Tétanos.
Lapin 83	2700	0 c.c. 25 chl. adrén., veine auriculaire.	2 c.c. TT. même veine.	∞
Lapin 88	1920	0 c.c. 17 chl. adrén., veine auriculaire.	0 c.c. 10 TT. autre v.	∞
Lapin 89	1990	0 c.c. 20 chl. adrén., veine auriculaire.	0 c.c. 10 TT. même v.	∞
Lapin 91	2310	0 c.c. 25 chl. adrén., veine auriculaire.	0 c.c. 33 TT. même v.	∞
Lapin 92	1980	0 c.c. 10 TT. veine auriculaire.	»	Tétanos.
Lapin 93	2030	0 c.c. 25 chl. adrén., veine auriculaire.	0 c.c. 33 TT. même v.	Tétanos.

Les résultats, ainsi qu'on le voit, ne sont pas constants : l'injection des deux substances dans la même veine donne les meilleurs, comme si l'intervalle de quelques minutes entre les deux inoculations n'empêchait pas la rencontre des deux corps, la toxine et l'adrénaline à l'état libre, ou fixé.

Il faut bien savoir que l'alcaloïde disparaît assez vite de la circulation : après une injection d'adrénaline chez le lapin, on n'en retrouve plus trace dans le sang, au bout de 10 minutes pour une dose mortelle, et au bout de 3 à 5 minutes pour les deux tiers et le tiers de cette simple dose; non pas que cette disparition soit due à une destruction ou à l'élimination de l'alcaloïde, mais à sa *fixation*, suivie elle-même d'une oxydation, dans le voisinage des terminaisons sympathiques, fixation élective au point qu'on a pu dire que si un organe réagit à l'adrénaline, c'est qu'il renferme la substance caractéristique des fibres sympa-

thiques et cela « avec autant de certitude qu'on déduit la présence d'un groupe phénolique de la réaction avec le fer » (1). (Cushny.) Cette fixation de l'alcaloïde sur les terminaisons sympathiques est peut-être en rapport avec l'action préventive de l'adrénaline, surtout lorsque la toxine se trouve introduite dans le même tronçon vasculaire qu'elle (2).

* * *

Depuis que l'importance fonctionnelle des capsules, entrevue en 1855 par Addison, a été mise en lumière par les travaux de l'École française (Brown-Séquard, Vulpian, Gley, Langlois, etc.), on sait qu'elles passaient pour détruire des poisons dans l'organisme, tels que ceux résultant du travail musculaire. C'est plus tard que l'attention s'est portée sur le rôle des surrénales dans les maladies infectieuses. La découverte de l'adrénaline par Takamine en 1901 devait faciliter l'étude expérimentale de ces glandes : nous voyons que ses résultats s'accordent avec les données cliniques et anatomo-pathologiques pour montrer qu'au nombre des moyens de défense de nature extrêmement complexe, que l'organisme oppose aux toxi-infections, il faut compter les surrénales et leur sécrétion, l'adrénaline. Pour ce qui est de la toxine tétanique, nos recherches montrent que, tout en neutralisant ses propriétés tétanigènes, cet alcaloïde lui conserve son pouvoir d'antigène, et qu'au contact de cette substance, la toxine devenue dialysable peut facilement provoquer l'apparition dans les humeurs des anticorps spécifiques.

(1) A noter que la forme dextrogyre de l'adrénaline reste sans action, d'où probabilité pour que le réactif des terminaisons sympathiques soit lui-même optiquement actif, bien que son signe soit encore inconnu.

(2) L'adrénaline s'attaque aux parois vasculaires comme le prouve, chez les lapins inoculés sous la peau, l'œdème dont le liquide est souvent hémorragique les jours suivants, le lieu de l'œdème pouvant même être atteint de nécrose. Le rat ne réagit par aucune lésion locale apparente à des injections d'adrénaline poursuivies pendant plusieurs semaines par voie sous-cutanée.

ÉTUDES SUR LA MÉNINGITE CÉRÉBRO-SPINALE ET SES FACTEURS MÉTÉOROLOGIQUES

FAITES DANS LA RÉGION DU DORSET (ANGLETERRE) DU 1er JUILLET 1915 AU 30 JUIN 1916

par ARTHUR COMPTON.

La méningite cérébro-spinale est une maladie soumise aux influences météorologiques. Cela résulte de son apparition saisonnière abondamment prouvée par les observations de plusieurs autorités, notamment celles de Netter et Debré (1), ainsi que d'observations personnelles, qui expliquent cette apparition en la rattachant à deux facteurs météorologiques particuliers : l'état hygrométrique et la température atmosphérique (2).

Je suis arrivé à cette dernière conclusion par l'étude minutieuse (basée sur la méthode graphique) d'une quinzaine de cas de maladie qui apparurent de 1914 à 1915 à Weymouth, petite localité maritime du Sud de l'Angleterre. Je constatai alors que la maladie se trouvait sous l'influence d'une forte humidité relative de l'atmosphère (saturation) combinée avec une grande égalité de température.

Le présent mémoire a pour but l'étude des rapports de la maladie avec ces deux facteurs météorologiques en vue de confirmer, ou, si besoin est, de modifier l'hypothèse déjà formulée. Elle porte sur 62 cas nouveaux. En même temps je me propose de montrer par cette même méthode l'influence d'autres facteurs météorologiques, que je n'avais pas encore étudiés faute d'avoir eu en main un nombre suffisant de faits.

Outre ces études principales, ce mémoire traite de quelques

(1) Netter et Debré, *La méningite cérébro-spinale*. Paris, 1911, p. 14-25 et 26-28.
(2) Arthur Compton, *Comptes rendus*, t. 161, 1915, p. 472-474 ; — *Jour. R. A. M. C.*, novembre 1915, p. 546-570. Voir aussi *Comptes rendus*, t. 165, 1917, p. 73-75.

observations relatives à la période d'incubation, au rôle que joue le surpeuplement dans la maladie, et à sa prophylaxie.

Conditions météorologiques.

L'ordre dans lequel les phénomènes météorologiques sont étudiés est le suivant :

1. Humidité . . ⎫
2. Température ⎬ atmosphériques.
3. Pression . . ⎭
4. Pluie.
5. Soleil.

Comme la région est assez étendue et que mes 62 cas proviennent de ses différentes parties, j'en indique sur la figure 1

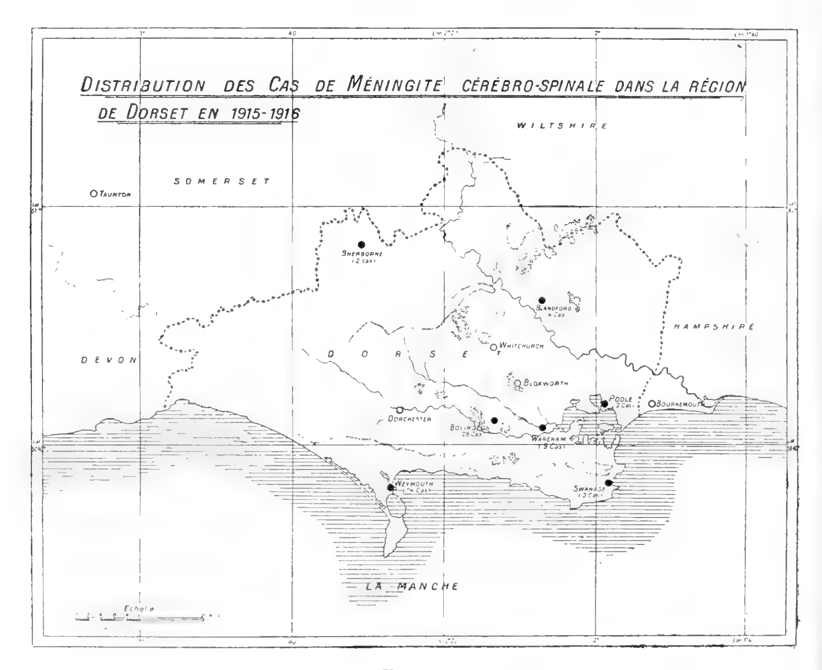


Fig. 1.

la répartition avec les centres où les facteurs météorologiques ont été enregistrés, ainsi que la configuration géographique de la région.

Sur cette carte ne figurent que les collines de plus de 120 mètres de hauteur.

Les 62 cas se répartissent ainsi :

28	cas.	à Bovington.
14	—	à Weymouth.
9	—	à Wareham.
4	—	à Blandford.
3	—	à Swanage.
2	—	à Poole.
2	—	à Sherborne.
62 (1)		

Avant d'aborder l'étude de chaque phénomène météorologique il est utile d'expliquer la méthode employée. Les mesures météorologiques (régulièrement faites chaque jour à 9 heures du matin) (2) ont été portées en ordonnées, le temps est porté en abscisses. Sur la courbe y relative, les cas sont marqués suivant leur localité et la date de leur apparition. Cette dernière a été soigneusement déterminée dès les premiers symptômes méningés (voir l'Appendice).

Humidité. — Considérons les figures 2 et 3. Elles indiquent les variations journalières de l'état hygrométrique pour les trois centres de la région : Weymouth, Dorchester et Bournemouth. Comme il m'a été impossible d'obtenir des mesures météorologiques pour Bovington — où la maladie sévit avec le plus de force — parce que personne ne s'intéressait à de telles mesures, tous les cas qui y sont apparus sont rapportés sur les courbes de Dorchester. J'espère que, ce faisant, l'erreur ne sera pas grande, les villes de Dorchester et Bovington jouissant des mêmes conditions climatériques, comme l'indique la

(1) Le cas « Mn », qui est plutôt un cas de Londres (Voir Appendice, n° 32) est compris dans le total de Weymouth; le cas « Mo », probablement un cas de Cornouaille (n° 48), est compris dans le total de Wareham; et le cas « Bt », qui paraît être un cas de Swansea (n° 12), est compris dans le total de Poole. Ces trois malades ont contracté la maladie pendant qu'ils étaient en permission. Les deux premiers étaient en garnison respectivement à Weymouth et à Wareham; le troisième à Swansea, mais il mourut à Poole.

(2) Pour ce qui concerne ces lectures météorologiques je dois mes remerciements à MM. : J. H. Bolam (Weymouth), H. D. Strange (Dorchester), C. Dales (Poole-Bournemouth), S. W. Bennett (Wareham), F. G. A. Lane (Bloxworth), H. H. T. Bassett (Whitchurch), J. Jacques (Blandford), T. Turton (Sherborne), T. Evans (Swansea), T. Thomas (Mullion, Cornouaille).

figure 1 ; elles sont en effet semblablement éloignées de la côte et également protégées du vent de la mer par la même chaîne de collines. De même, les cas de Blandford et Sherborne sont rapportés aux courbes de Dorchester comme étant des stations de l'intérieur dont les lectures hygrométriques me manquaient. De même aussi les cas de Wareham, Swanage et Poole sont rapportés aux courbes de Bournemouth, ces trois centres étant pareillement éloignés de la mer.

Un simple coup d'œil nous suffit pour voir que d'une façon générale, il existe entre ces courbes des différences individuelles assez marquées, qui sans doute se trouvent expliquées par la situation géographique.

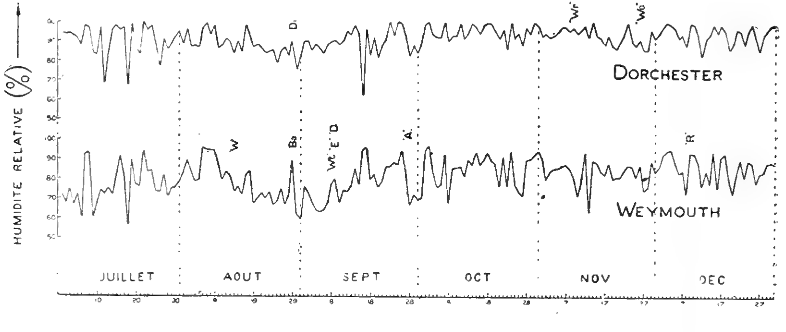


Fig. 2.

Il est donc évident qu'en recherchant le rapport entre l'humidité et l'apparition de la méningite cérébro-spinale, il faut envisager les cas d'un endroit donné, par rapport à l'humidité de cet endroit même, ou, si cela est impossible, à celle d'un endroit peu distant et jouissant des mêmes conditions climatériques.

Si l'on étudie maintenant les cas de méningite cérébro-spinale répartis sur ces courbes, on verra que pour la plupart l'apparition de la maladie correspond aux *maxima* des courbes. A cet égard même les maxima généraux ne semblent pas si importants en déterminant l'apparition de la maladie que les *maxima individuels* : fait déjà signalé dans nos premières études (*loc. cit.*).

Donc, le rapport entre la méningite cérébro-spinale et l'état hygrométrique de l'air se trouve confirmé.

Sur les 59 cas des courbes ci-dessus, 2 seulement : « W » et « F » tombent sur des points *minima*. Les autres, qui équivalent à 97 p. 100, suivent la règle. Le cas « F » peut en réalité ne pas être une exception, car il faut noter (voir Appendice, n° 51) qu'il se rapporte à la petite localité de Blandford dont je n'ai pu me procurer les mesures hygrométriques pour l'endroit même. Quant à « W » (femme), il est possible qu'elle n'ait pas été atteinte de vraie méningite cérébro-spinale, car,

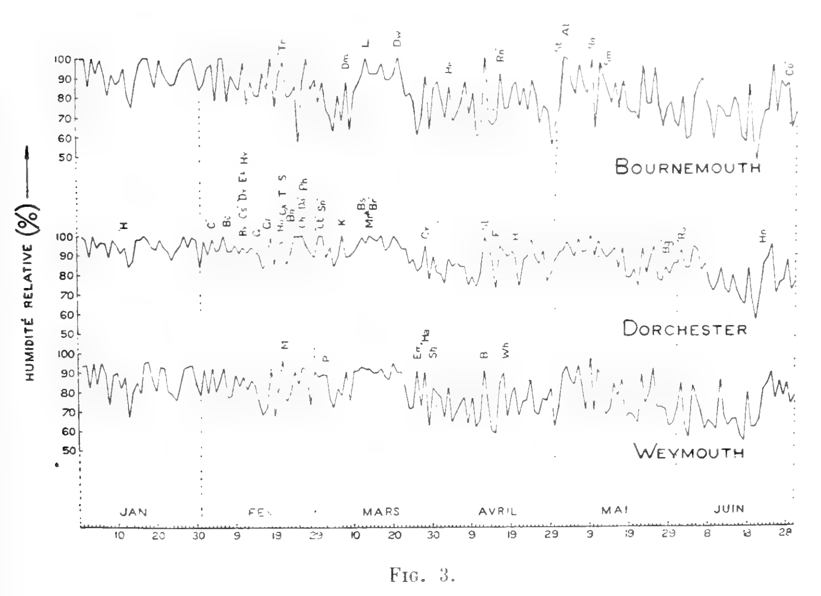


Fig. 3.

au point de vue laboratoire, le cas n'était pas net, les cellules prédominantes du liquide céphalo-rachidien étant des lymphocytes. Cependant ces deux cas, comme nous le verrons plus loin, sont associés avec la pluie, par la date de l'apparition de la maladie.

De plus, les 3 cas « Bt », « Mn » et « Mo », qui ne sont pas indiqués sur la figure 3, mais dont il s'agit dans la note au bas de la troisième page de ce mémoire, doivent être étudiés à part, car j'ai pu obtenir les mesures de l'état hygrométrique pour les différents endroits auxquels se rapporte le début de la maladie.

Le soldat « Bt » tombait malade dans le train de nuit allant de Swansea (Pays de Galles) à Poole (Dorset) où il devait

arriver à 4 heures du matin. L'humidité relative, d'après les lectures psychrométriques de Swansea et Poole, était comme suit :

	HUMIDITÉ RELATIVE p. 100	
	A SWANSEA	A POOLE
	—	—
Le 21 janvier	96,5	99,0
Le 22 —	76,0	83,0
Le 23 —	89,0	89,0

Bien que l'humidité relative de Swansea et de Poole au matin du 23 janvier fut 89 p. 100, il n'est pas du tout improbable que, dans la nuit du 22 janvier, l'humidité relative de l'air du train, sur le parcours de Swansea à Poole, lui eût été supérieure.

Le soldat « Mn » quitta Weymouth en bonne santé, le vendredi 26 février, pour quelque jours de permission qu'il devait passer à Londres. Samedi, il prit mal à la gorge, mais n'en fut pas indisposé. Il retourna à Weymouth dans la nuit de dimanche; il se plaignit alors de douleurs dans les membres qu'il attribua à du *rhumatisme*. Les lectures hygrométriques (1) pour cette période, à Londres, étaient les suivantes :

	HUMIDITÉ RELATIVE p. 100
	—
Le 26 janvier	80
Le 27 —	81
Le 28 —	100

L'humidité de l'air à laquelle cet homme fut exposé le matin qu'il quitta Londres était celle d'une saturation complète. Donc, si l'on admet que son mal de gorge ressenti la veille était causé par le méningocoque, on peut voir, d'après nos idées (2), que les conditions atmosphériques du jour suivant

(1) Bureau du *Lancet*, Londres (le calcul d'humidité ayant été fait d'après Marriot : *Hints to Meteorological Observers*, London, 1911, p. 58-60).

(2) On doit plutôt s'imaginer la manière par laquelle une brusque saturation de l'atmosphère par la vapeur d'eau peut conduire le méningocoque du rhino-pharynx aux méninges que de la décrire, car il n'existe à l'heure actuelle aucune preuve expérimentale de l'accomplissement de ce phénomène. Mais trois alternatives peuvent être suggérées :

1° Sous l'influence de l'air humide — particulièrement l'air chaud et non

étaient en parfait état pour assurer la migration du microbe du rhino-pharynx aux méninges.

Le soldat « Mo » quitta Wareham pour la Cornouaille le 5 avril, ayant mal à la gorge. Il passa la nuit dans la salle d'attente de la gare Guinear Road, Cornouaille, ayant manqué son train pour Helston. Il arriva chez lui le 6 au matin et tomba malade le même soir. Dans la matinée du jour suivant, quand le docteur le vit pour la première fois, il diagnostiqua la méningite.

renouvelé que l'on respire dans les chambres et baraquements trop peuplés — il peut se faire que quelque changement d'ordre physique s'opère sur la muqueuse du rhino-pharynx, la rendant plus spongieuse. Il résulterait de cela que les méningocoques des « porteurs » pourraient perforer la membrane et, en la traversant, entrer dans le système pour arriver sous peu (question d'heures) aux méninges, créant le même jour les symptômes de méningite. A l'appui de cette manière de voir on peut citer quelques observations de Hill (*Brit. Med. Jour.*, avril 1916, p. 541). Ce savant a trouvé que la muqueuse nasale, examinée à l'aide du speculum, se montre en certaines circonstances gonflée, congestionnée, faisant creux au toucher de la sonde et induite d'une épaisse sécrétion; tandis qu'examinée dans d'autres circonstances elle apparaît pâle, lisse, reste intacte au toucher, et la sécrétion en est absente. La première description se rapporte à des individus exposés à respirer l'air des chambres surabondamment peuplées, mal aérées et surchauffées ; tandis que la deuxième se rencontre chez des sujets examinés au dehors par les beaux temps.

2° Les événements peuvent encore se présenter ainsi : Nous savons d'une part que le microbe de la méningite cérébro-spinale se développe plus favorablement sur les milieux de culture artificiels lorsqu'ils sont pourvus d'une grande humidité (ancienne observation de laboratoire). D'autre part nous savons, d'après les observations de O'Connell (*The Lancet*, août 1916, p. 342), qu'il se produit une légère élévation de température lorsqu'on respire de l'air humide, due, sans doute, à la réserve de chaleur provenant d'une moindre évaporation corporelle. Or, d'après Dopter (Cours de bactériologie à l'Institut Pasteur), la température optimale pour la culture du méningocoque sur des milieux artificiels est 38° C. Il est donc possible que le microbe au rhino-pharynx du « porteur » se trouve dans des conditions plus favorables pour se multiplier rapidement et devenir virulent, lorsque l'air respiré est très humide. Il peut se faire aussi que le microbe sécrète plus de son ferment lytique (Flexner, cité par Netter et Debré, *loc. cit.*, p. 54) qui, en attaquant la muqueuse même, produise de minuscules plaques de nécrose, à travers lesquelles le méningocoque peut pénétrer dans le système et par suite arriver aux méninges.

3° Ou bien encore le cours des événements peut être le suivant : Quand on respire de l'air humide la circulation sanguine à travers la muqueuse nasale est plus faible et par conséquent l'épanchement lymphatique moins considérable, parce qu'en ces circonstances il faut une moindre évaporation d'eau de la membrane muqueuse pour saturer à la température corporelle l'air inhalé. Il en résulterait une plus faible défense contre des bactéries d'invasion, puique, selon Hill (*ibid.*), la vitesse d'évaporation de la membrane est un facteur de la première importance en favorisant le débordement lymphatique qui neutralise l'infection en emportant les bactéries (Hypothèse de Hill à l'égard des *rhumes*).

Ci-joint un aperçu sur l'état hygrométrique de l'air pour la région pendant cette période :

	HUMIDITÉ RELATIVE p. 100
Le 5 avril	86,0
Le 6 —	96,0
Le 7 —	89,0

On peut voir d'après ces chiffres que l'humidité de cette région, supérieure à 90 p. 100, était fort élevée quand « Mo » tomba malade. Pour ce cas donc, comme pour tous les autres, il est à noter que l'apparition de la maladie coïncide avec une forte humidité.

Température. — On a déjà vu, lors de l'analyse de notre quinzaine de cas de Weymouth, pendant les mois de mars à juin 1915, que la température atmosphérique jouait un rôle important en ce qui concernait l'apparition de la maladie (1). Nous avons vu que celle-ci tendait à se déclarer plus fréquemment quand la différence entre la température maximum et la température minimum n'était pas trop accentuée, c'est-à-dire lorsqu'il existait une certaine égalité de température. J'avais proposé une interprétation microbienne de ce fait (1), mais en réalité aucune explication de ce genre n'est nécessaire, pour des raisons météorologiques que nous verrons tout à l'heure.

Mais voyons d'abord si l'énoncé fondamental se trouve confirmé, pour les 59 cas apparaissant dans la région pendant cette période. A cet égard considérons les figures 4 et 5. Sur celles-ci les courbes des centres géographiques sont plus nombreuses que celles des figures 2 et 3, pour la raison que j'ai pu obtenir plus de lectures sur la température de la région que sur l'humidité. Ainsi trouvera-t-on des courbes de presque toutes les villes où a sévi la maladie.

Si l'on compare les courbes entre elles on peut faire la remarque déjà faite pour celles de l'humidité : elles se ressemblent d'une façon générale, mais avec des différences individuelles. Quant à la position des cas, à quelques exceptions

(1) *Loc. cit.*

près ils tombent encore sur les points *maxima* des courbes; les maxima individuels sont encore spécialement choisis. Les ordonnées de ces courbes de température étant le rapport de la température minimum à la température maximum — et non, comme dans le mémoire cité (1), le rapport de la différence entre les températures maxima et minima à la température maximum — les conditions égales de température sont indiquées par des *maxima* sur les courbes. Ainsi donc, le principe déjà énoncé de l'apparition des cas avec des conditions égales de température se trouve confirmé.

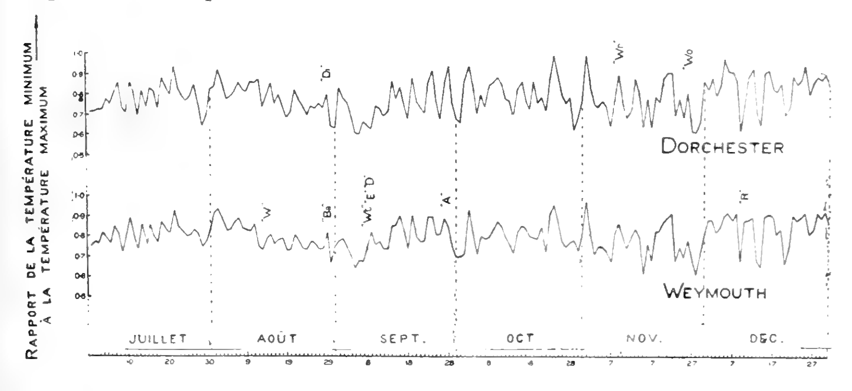


Fig. 4.

Sur les 59 cas figurant sur les courbes, 9 seulement : « Mn », « R », « Sm », « Gr », « F », « Hs », « Bs », « Mi » et « Bg » font exception à la règle; c'est-à-dire que 50 sur 59 y obéissent, soit 85 p. 100.

Voyons maintenant pourquoi, *a priori*, pour des raisons météorologiques, cela doit être ainsi. A cet égard comparons, d'abord, n'importe quelle courbe de température avec la courbe correspondante d'humidité, — par exemple, les courbes de Weymouth des figures 2 et 4. On remarque au premier abord que, quoique bien distinctes, elles sont semblables dans l'ensemble. Une élévation générale apparaît sur les deux courbes, avec un maximum situé vers la fin de la troisième semaine de juillet, suivi d'une dépression correspondante dans la quatrième semaine de juillet; une nouvelle élévation apparaît sur

(1) *Loc. cit.*

les deux courbes dans la première semaine d'août; celle-ci est suivie d'une dépression générale avec un minimum vers la fin d'août et le commencement de septembre; puis, vers la fin de septembre une dépression individuelle apparaît sur les deux courbes durant la même période; ensuite, les deux courbes suivent une course similaire. Donc, d'une façon générale, on

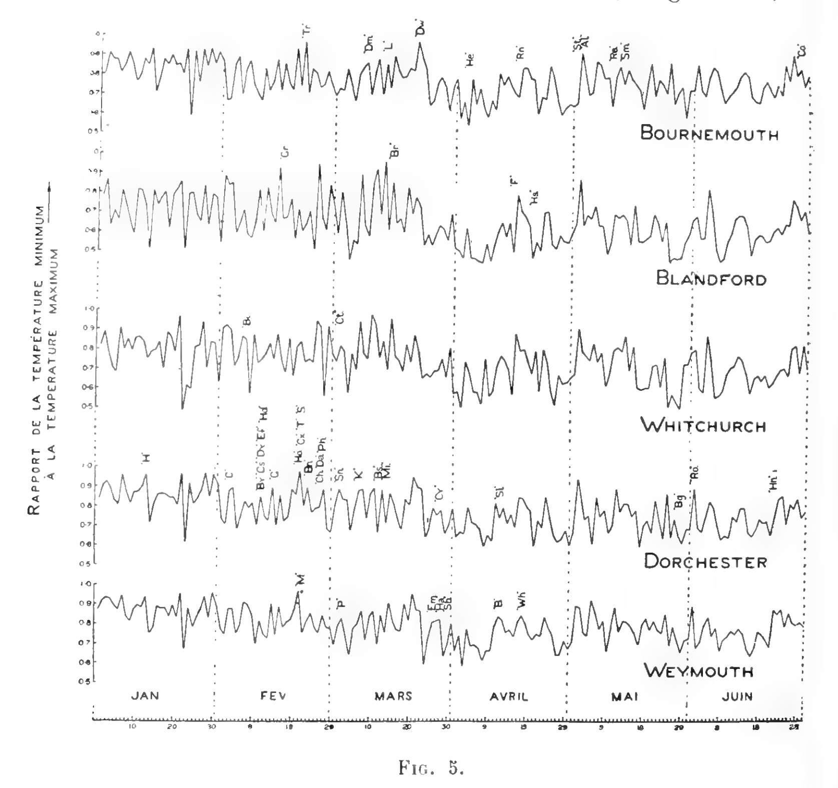


FIG. 5.

voit que nos courbes de température et d'humidité gardent plus ou moins le même aspect : des *maxima* de température correspondent presque toujours à des *maxima* d'humidité, et des *minima* aux *minima*. Autrement dit, une haute humidité relative entraîne des conditions égales de température et *vice versa*. Pourquoi en est-il ainsi?

Conditions égales de température signifient que la température de la nuit et celle du jour sont à peu près égales. Une question s'impose : pourquoi ces deux températures sont-elles

presque égales quand l'atmosphère est saturée de vapeur d'eau? En voici l'explication.

Quand l'atmosphère est saturée de vapeur il se produit, pendant la nuit, un refroidissement sous l'influence duquel la vapeur se condense — c'est ainsi que sont formés les nuages, qui éventuellement retombent en pluie — cédant à l'atmosphère environnante de la *chaleur latente de vaporisation* libérée. Cet apport de chaleur tend à s'opposer au refroidissement, et ainsi se trouve réalisée l'égalisation relative des températures. D'autre part, quand l'atmosphère est plus ou moins saturée de vapeur, cette dernière, ne se laissant pas pénétrer par la chaleur, maintient à quelques mètres du sol celle qui pendant la nuit se dégage de la terre. Cette simple explication nous fournit une nouvelle explication de l'égalité relative des température diurne et nocturne lorsque l'humidité de l'air est élevée. D'ailleurs, dans la partie se rapportant au soleil, cette dernière raison sera plus amplement développée.

Il paraît donc exister une relation de cause à effet entre une haute humidité relative de l'air et les conditions de l'égalité de température. La méningite cérébro-spinale, se plaçant sous la dépendance de l'humidité atmosphérique, devrait corrélativement dépendre de la température atmosphérique.

Pression. — Puisque la méningite cérébro-spinale semble faire son apparition en même temps que s'opère dans l'atmosphère une brusque élévation d'humidité, et que l'air humide est plus léger que l'air sec, on devrait trouver — si notre raisonnement est juste — des apparitions de cas concomitantes avec des chutes barométriques. Or, si nous considérons la figure 6, nous pouvons voir que cela est généralement exact; car, sur les 49 cas y figurant, 34, c'est-à-dire 69 p. 100, coïncident avec une descente du baromètre.

Sur cette figure nous voyons que les courbes des pressions barométriques en divers endroits de la région pendant la période indiquée, en particulier à Weymouth, Dorchester et Bournemouth, sont quasi identiques eu égard aux variations journalières. A ce point de vue la courbe de la pression atmosphérique présente un contraste frappant avec celles de l'humidité et de la température.

Corrélativement, la pression atmosphérique n'est pas un indicateur sensible pour juger de l'apparition de la méningite cérébro-spinale, comme le sont les deux autres.

Pluie. — Pour ce qui concerne la pluie, on peut faire les mêmes remarques générales que celles déjà faites sur la pression barométrique, c'est-à-dire que, puisque l'apparition de la maladie dépend de l'humidité atmosphérique, cette dernière de

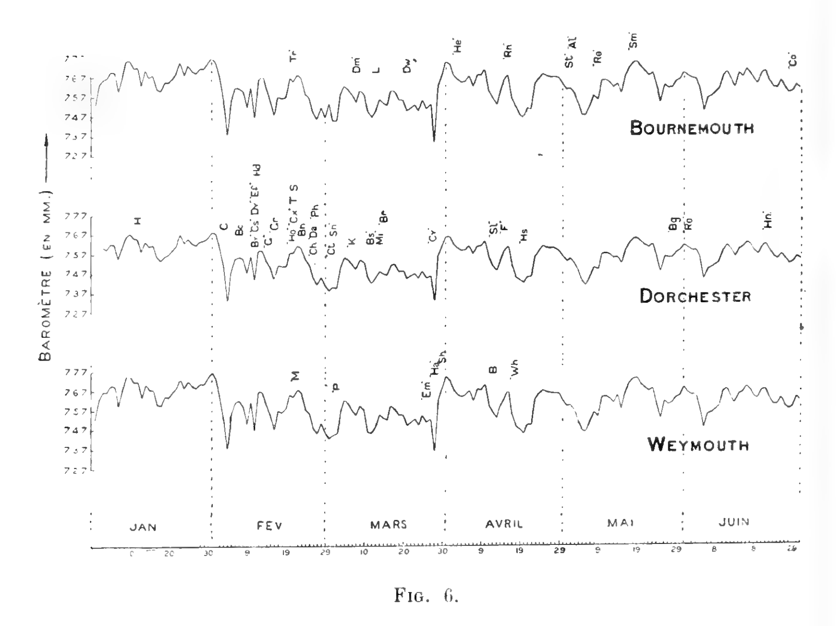


Fig. 6.

la pluie et *vice versa*, il devrait exister un rapport très étroit entre la pluie et l'apparition de la maladie.

Des mesures pluviométriques très complètes ont été faites dans la région. Elles sont représentées graphiquement sur les figures 7 et 8. Il existe une uniformité si frappante entre les courbes que les lectures de n'importe quel centre auraient pu être utilisées pour l'étude en question.

Sur la figure 8 les lectures de Dorchester ne figurent pas et sont remplacées par celles de Bloxworth ; en conséquence les cas de Bovington sont inscrits sur la courbe de Bloxworth, ce dernier village étant plus proche de Bovington que de Dorchester. De plus, d'une façon générale la quantité d'eau tombée

à Bloxworth fut moindre que celle tombée sur Dorchester (voir la figure 7).

Considérons maintenant quel rapport peut exister entre la pluie et l'apparition de la maladie. On voit tout de suite que dans la majorité des cas l'apparition de la maladie s'associe avec celle de la pluie tombée soit la veille ou le jour même.

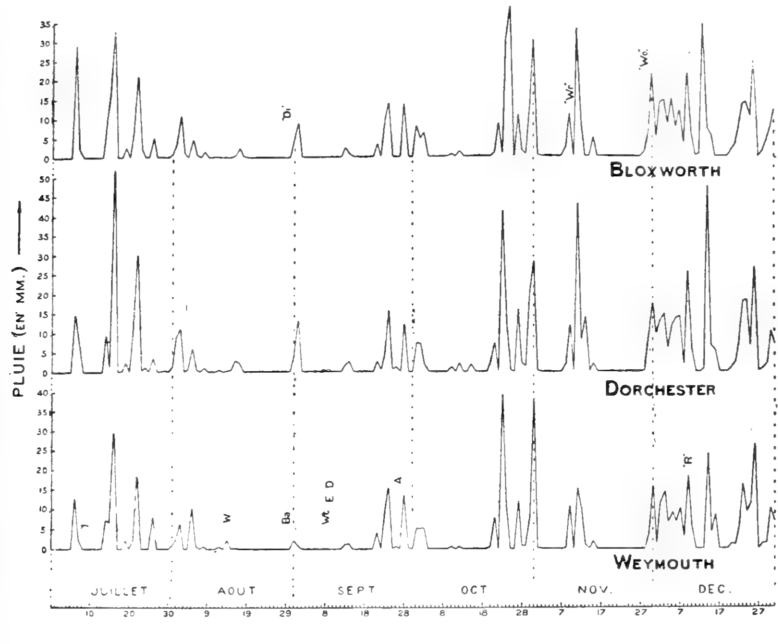


Fig. 7.

Voici, pour les 59 cas indiqués sur les deux figures, leurs rapports avec la pluie :

Pluie	3 jours avant	1
	2 jours avant	3
	La veille	29
	Le jour même	16
	Le jour suivant	7
Sans pluie du tout, soit 2 ou 3 jours avant, le jour même, ou le jour suivant		5
		59

Ainsi 5 cas seulement, soit 8,5 p. 100, semblent n'avoir rien à faire avec la pluie, tandis que les 54 autres, ou 91,5 p. 100,

sont associés à la pluie. Mais, si nous séparons de ce dernier groupe les deux cas « Sh » et « Hn » (fig. 8), associés respectivement avec la pluie 3 et 2 jours avant, et les sept cas

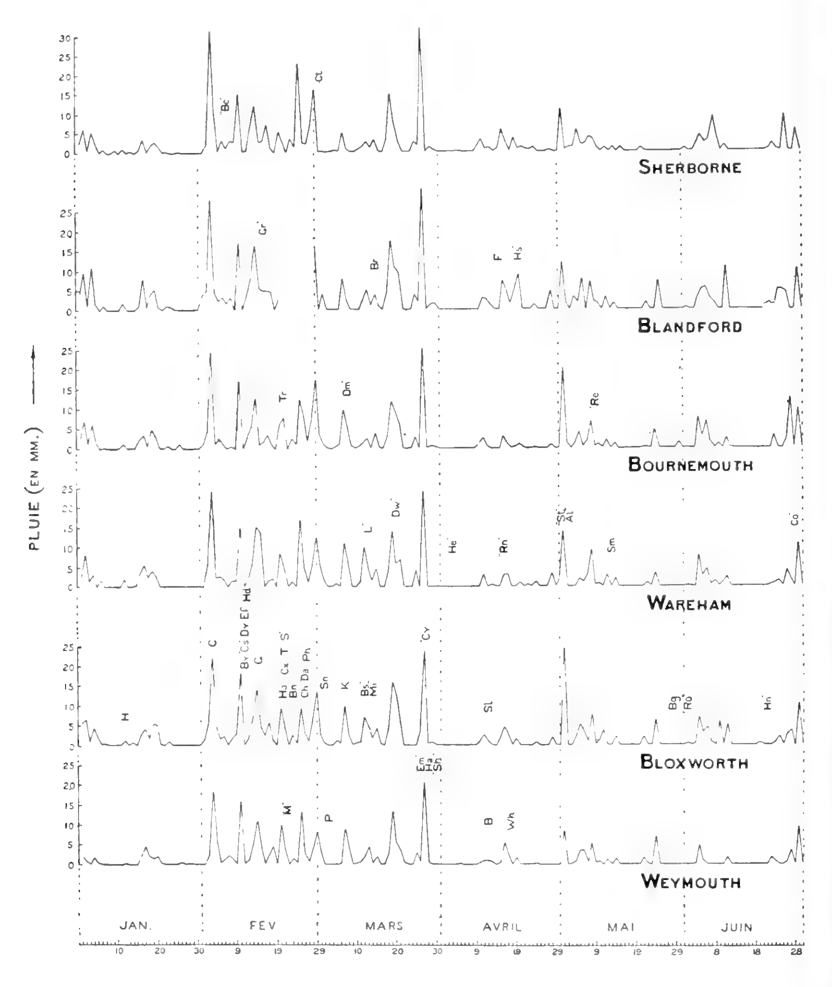


Fig. 8.

« A », « Di », « Wo », « Ba », « F », « Em » et « Co », associés avec la pluie après l'apparition de symptômes de la méningite, il nous restera encore le chiffre substantiel de 45 cas sur 59 (soit 76 p. 100), qui, ceux-là, apparaissent vraiment le même jour que la pluie ou au plus 24 heures après.

La courbe de Bloxworth de la figure 8 est d'un intérêt tout spécial. Elle nous montre, même mieux que ne le fait la courbe d'humidité de la figure 3, le rôle important que joue l'humidité atmosphérique en déterminant le début de la maladie. Pendant les mois de février et mars une petite épidémie de méningite cérébro-spinale sévit sur le camp de Bovington; la courbe de Bloxworth de la figure 8 ne laisse aucun doute sur l'association de cette épidémie avec l'humidité et avec la pluie.

Il est à remarquer, d'après l'exposé ci-dessus, que plusieurs de ces cas font leur apparition en des jours qui suivent une journée de grande pluie. L'explication en est fort simple. L'évaporation subséquente de la pluie tombée sur le sol demande quelques heures pour produire la saturation de l'air. Il est donc évident que c'est par ce processus que la pluie favorise le début de la maladie.

Les arbres et la végétation doivent entrer pour quelque chose dans l'accomplissement de ce phénomène. Voyons quelle part peut leur être attribuée. Dans les endroits boisés, premièrement une grande quantité de pluie est retenue sur les feuilles, tandis que, deuxièmement, elles sont surabondamment nourries par l'humidité provenant de leurs racines; elles ajoutent donc après la pluie, par évaporation et conduction, une grande quantité de vapeur d'eau dans l'atmosphère. Il se produit alors une perte considérable de chaleur, qui abaisse singulièrement la température des feuilles. Ainsi l'air chargé de vapeur d'eau, et qui se trouve en contact avec ces dernières, est amené de plus en plus près de son point de saturation.

En outre, nous savons que les arbres attirent la pluie, parce qu'ils sont de bons radiateurs et qu'ils perdent rapidement leur chaleur, spécialement pendant la nuit. Le refroidissement qui résulte de leur surface, diminuant la propriété que possède l'air de retenir l'humidité absorbée, amène ainsi la condensation de cette vapeur en eau, qui retombera en pluie.

La situation du camp de Bovington à l'égard des arbres, comme nous le montre la figure 1, semble telle que nous pouvons y trouver peut-être l'explication du fait que ce centre a été éprouvé plus qu'aucun autre dans la région.

Soleil. — La figure 9 nous montre un graphique du soleil pour la région pendant les six premiers mois de 1916, quand la maladie fut portée à son plus haut point. Elle nous montre que l'intensité solaire quotidiennement enregistrée fut partout à peu près la même dans les différents endroits, tant se ressemblent les trois courbes 9.

La majorité des 49 cas inscrits sur la figure 9 tombent sur des jours où le soleil n'était pas enregistrable; en vérité, 9 cas seulement, ou 18 p. 100, sur des jours où le soleil a brillé pendant plus de cinq heures.

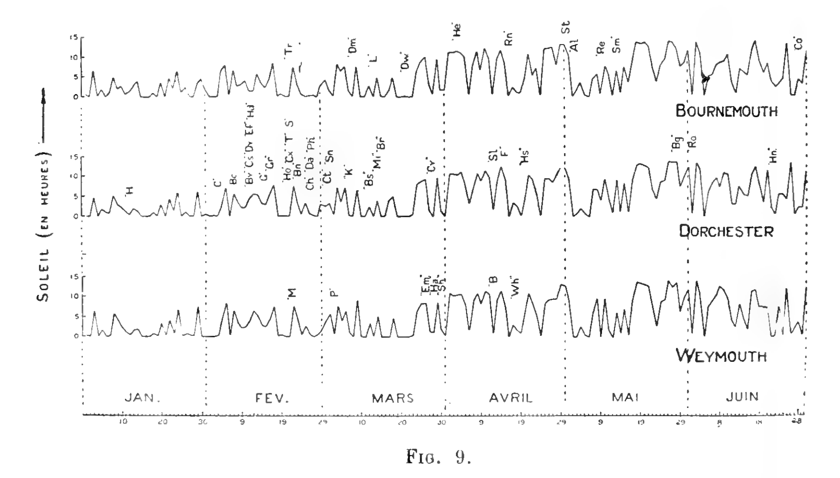


Fig. 9.

Le résultat était à prévoir eu égard aux rapports que les phénomènes météorologiques ont entre eux, et à la dépendance établie entre l'apparition de la maladie et les deux facteurs cosmiques humidité et température.

Nous avons vu les rapports existant entre l'humidité et la température. Examinons maintenant leurs relations avec l'activité solaire. Il est évident, en comparant entre elles les courbes des figures 3, 5 et 9, que les *maxima* d'humidité (indiquant la brusque saturation de l'air par la vapeur d'eau), et celles de température (indiquant une égalité relative de la température atmosphérique), correspondent aux *minima* des courbes de soleil. Par exemple, d'après la figure 9, un minimum bien accentué se dessine vers le milieu de janvier, un second juste avant la fin de ce même mois, un troisième au

commencement de février, un autre vers le milieu de mars, et enfin dans la première semaine de mai; tous correspondent à des *maxima individuels* d'humidité et de température. Nous apercevons encore deux maxima en avril, l'un au commencement du mois et l'autre à la fin, qui, de même que celui de la fin de mai, correspondent avec des minima d'humidité et de température pour cette période. Donc l'apparition des cas de méningite cérébro-spinale en association avec peu de soleil se trouve expliquée par le rapport existant entre ce dernier et une haute humidité, donnant lieu à des conditions égales de température.

Nous pourrions, par un exposé théorique très bref, expliquer ces relations intimes. Quand un jour donné on n'enregistre point, ou seulement peu de soleil, cela indique que le ciel était nuageux; la cause en est due à la saturation de l'atmosphère par la vapeur d'eau, résultant de la condensation en eau de cette vapeur, dans les couches supérieures de l'atmosphère, parce que l'air humide, montant en vertu de sa faible densité, s'y refroidit. Or, à cause de l'infime *diathermanéité* de la vapeur d'eau, prise au point de vue de sa faible puissance à transmettre les radiations thermiques — contrastant avec sa forte transparence aux radiations lumineuses, — la surface de la terre reçoit logiquement moins de chaleur ce jour-là, et de même l'air ambiant, qui d'ordinaire la reçoit par rayonnement de la terre, en reçoit aussi beaucoup moins. Ce jour-là, la température maximale est donc relativement plus basse. Pour une raison analogue, la température de nuit, ou température minimale, est relativement plus haute, grâce à cette couche de vapeur d'eau qui, s'étendant au-dessus de la terre, y maintient la chaleur. Nous voyons donc pourquoi la saturation de l'atmosphère par la vapeur d'eau a pour résultat peu de soleil enregistrable et une certaine égalité de température.

Période d'incubation.

Tout dépend de ce que l'on veut dire par période d'incubation, car, en ce qui concerne la méningite cérébro-spinale, deux cas se présentent.

Nous pouvons entendre sous ce vocable : 1° le laps de temps entre le moment où un individu devient « porteur des germes » et où il tombe malade de symptômes méningés ; ou bien : 2° l'intervalle de temps pris par le méningocoque — déjà, depuis longtemps ou depuis peu, dans le rhino-pharynx du « porteur » — pour traverser la muqueuse rhino-pharyngée, pénétrer dans le système, gagner les méninges, et y produire les symptômes caractéristiques.

C'est à ce deuxième cas seul que nous nous arrêterons :

Si l'on accepte qu'une haute humidité (ou plutôt une saturation subite de l'atmosphère par la vapeur d'eau) et l'invasion des méninges ont une relation de cause à effet, nous pouvons dire que la période d'incubation n'est qu'une question d'heures. Car l'évolution ne s'accomplit que par une brusque saturation atmosphérique, et l'on sait, d'autre part, que l'état hygrométrique n'est pas fixe du matin au soir, comme le prouvera un simple coup d'œil sur n'importe quelle courbe des figures 2 et 3.

Ainsi, souvent dans les cas militaires, comme par exemple pour « By », « Cs », « Dy » et « Ho » (voir Appendice, n°s 16, 15, 17, 22), nous constatons que le malade était très bien le matin, en se levant, sauf quelquefois un léger mal de gorge, mais qu'il revient de l'exercice l'après-midi, avec tous les symptômes de la méningite pleinement déclarés (maux de tête, vomissements, raideur des jambes, etc., etc.). Pour presque tous, l'humidité relative de l'air — voir figures 2 et 3 — était fort élevée le matin.

Le cas de « R » (Appendice, n° 10) est d'un intérêt tout particulier à ce sujet. La maladie chez lui se déclare soudainement, après qu'il a pris un bain, alors qu'il se permet de flâner au moins une heure dans l'atmosphère très humide de la salle. Un autre cas bien instructif dans ce même sens est celui de « Hn » (voir l'observation, Appendice, n° 61). Pour ces deux cas de méningite, comme pour la plupart de nos cas, la période d'incubation est de si courte durée qu'on la peut dire éphémère.

Surpeuplement.

Selon nos idées, l'apparition de la maladie marque le terme de deux étapes bien différentes, mais successives. La première comprend l'invasion, par le méningocoque, du rhino-pharynx de l'individu bien portant, créant l'état de « porteur » des germes. L'invasion des méninges par ce même microbe, constituant la méningite cérébro-spinale, en est la seconde et dernière ; mais celle-ci ne s'accomplit pas toujours. Elle reste sous la dépendance des conditions atmosphériques indiquées et de l'état de plus ou moins grande sensibilité du « porteur ».

Il serait utile de connaître jusqu'à quel point le surpeuplement peut faciliter le passage du méningocoque du pharynx nasal aux méninges. Mais pour développer cette question, il faudrait posséder des données que je n'ai pu recueillir : observations comparatives sur la vitesse de l'apparition de la maladie parmi les « porteurs » non en traitement, vivant dans des conditions différentes d'aménagement.

Mais je puis ajouter, en passant, que, durant l'épidémie du camp de Bovington de février et mars 1916, il me semblait que jamais nous ne serions capable d'arrêter la contagion, jusqu'à ce que vint du quartier général un ordre formel portant sur la ventilation des baraquements. Il était rigoureusement défendu de fermer les fenêtres durant les heures de sommeil, de façon à neutraliser l'effet du surpeuplement.

Quoique cela soit en parfait accord avec nos idées théoriques (voir la note 2 du paragraphe *Humidité*), il ne faut pas le prendre trop à la lettre, avant que ce ne soit confirmé par de nouvelles expériences, car il est toujours possible que l'épidémie s'éteignît d'elle-même, à l'approche de l'été.

Résumé. — Prophylaxie.

Le début de la maladie, c'est-à-dire l'invasion des méninges par le méningocoque provenant du rhino-pharynx du « por-

teur » des germes, est soumis à l'influence de trois facteurs météorologiques principaux, liés d'ailleurs les uns aux autres : saturation de l'atmosphère par la vapeur d'eau, égalité de température et peu de soleil.

Ainsi se trouve confirmée notre conclusion de 1915, et notre hypothèse cosmique d'alors s'en trouve plus solidement établie.

Pour la santé des troupes, ces faits nous montrent la nécessité de bien choisir d'avance les lieux d'installation des nouveaux camps, car deux localités relativement voisines peuvent présenter des conditions hygrométriques très différentes. Il faut remédier, d'autre part, dans les anciens camps, à l'humidité extérieure, par un système de drainage et d'égouts et une bonne ventilation sous les baraquements.

Il est même possible qu'il faille aller jusqu'à envisager dans certaines régions l'abatage des forêts au voisinage des camps, celles-ci entretenant parfois une humidité excessive.

Il importe aussi de combattre, dans les anciens camps et locaux occupés par les troupes, l'humidité intérieure, qui facilite par surpeuplement la propagation des « porteurs ». De même, pour empêcher l'éclosion de la maladie chez les porteurs nous devons, d'après nos idées théoriques (note précitée), nous attacher à éviter l'humidité à l'intérieur. Cela peut et doit être obtenu par une ventilation active.

A cet égard, on installera des hygromètres dans tous les endroits clos où se trouve un rassemblement de personnes, pour s'assurer de façon précise, à chaque instant, que la ventilation est suffisante, et éventuellement nous indiquer si l'on doit ouvrir une fenêtre de plus.

Il faut éviter naturellement de faire sécher les capotes et tous vêtements mouillés dans les locaux habités.

Tous ces faits font du méningocoque un indicateur important du climat, et de la muqueuse nasale un hygromètre d'une sensibilité extrême.

*
* *

APPENDICE

Date d'apparition de la maladie.

De façon à fixer aussi exactement que possible la date d'apparition de la maladie, en vue de nos courbes météorologiques, une lettre circulaire fut rédigée et envoyée aux différents malades relevés de la maladie, ou à leurs proches, les priant de bien vouloir répondre aux cinq questions suivantes :

(1) Quel jour le malade sentait-il son mal?

(2) De quoi se plaignait-il?

(3) Se plaignait-il de maux de gorge quelques jours avant?

(4) Que faisait-il la veille du jour où il tomba malade?

(5) Quel jour consulta-t-il son médecin pour la première fois?

Les réponses aux trois questions essentielles proviennent des lettres originales, traduites presque littéralement, lesquelles sont en ma possession. Le tableau suivant en contient un bref résumé des 62 cas. Pour ceux dont je n'ai pu recueillir des rapports personnels, j'ai consulté les archives de leurs hôpitaux respectifs.

TABLEAU

NUMÉRO DES CAS	NOMS	LOCALITÉ	QUESTIONS POSÉES POUR FIXER LA DATE avec la source des	
			(1) Quel jour le malade ressentit-il les premiers symptômes ?	(2) De quoi se plaignait-il ?
1	W... (civile).	Weymouth.	Le 14 août 1913.	Grand mal de tête.
2	Di... (militaire).	Bovington.	Admis à l'hôpital le 29 août. Dit avoir été malade le 28.	Maux de tête, photophobie, rétraction de la tête.
3	Ba... (militaire).	Weymouth.	Le 20 août.	Vomissements et mal de tête.
4	Wt... (civile).	»	Le 8 septembre.	Maux de tête avec faiblesses et envie de vomir.
5	E... (militaire).	»	Admis à l'hôpital le 8 septembre.	Maux de tête, torpeur et rigidité du cou.
6	D... (militaire).	»	Le 9 septembre.	Symptômes caractéristiques.
7	A... (militaire).	Swanage.	Porté malade à la visite du 29 septembre. Admis à l'hôpital le 1er octobre, comme un cas de *pneumonie*.	Douleur sous l'omoplate droite et le long de la jambe même côté. Plus tard, fortes douleurs à la nuque, puis délire.
8	Wr... (militaire).	Bovington.	Admis à l'hôpital militaire le 10 novembre.	Torpeur, rigidité, rétraction de la tête, délire et éruption sur le tronc.
9	Wo... (militaire).	»	Admis à l'hôpital militaire le 26 novembre.	Torpeur, vomissements, rétraction de la tête, puis agitation fébrile.
10	R... (militaire).	Weymouth.	Le 10 décembre.	Maux de tête, raideur du cou et vomissements.

)ES 62 CAS

)U DÉBUT DE LA MALADIE enseignements		OBSERVATIONS	TRAITEMENT AU SÉRUM ANTI-MÉNINGOCOCCIQUE — Evolution
(3) Avait-il mal à la gorge avant ?	Source des renseignements		
Non.	Écrit de la malade.	—	Guérison.
—	Rapports des camarades et Archives de l'hôpital.	Début probable le 28-29 août.	Guérison.
Non.	Rapport personnel du malade.	—	Guérison.
Non.	Écrit de la malade.	—	Guérison.
—	Archives.	Première ponction lombaire le 19 septembre. Début probable le 8 septembre.	Guérison.
—	Note du laboratoire.	—	Guérison.
—	Archives de l'hôpital.	L'examen *post mortem* révéla la méningite cérébro-spinale. Début probable le 27-28 septembre.	Mort le 7 octobre.
—	Archives.	Début probable le 9 novembre.	Mort le 16 novembre.
—	Archives.	—	Mort le 29 novembre.
Non.	Écrit du malade.	Subitement après un bain, ayant passé une heure dans la chambre de bain.	Guérison.

NUMÉRO DES CAS	NOMS	LOCALITÉ	QUESTIONS POSÉES POUR FIXER LA DAT[E] avec la source de (1) Quel jour le malade ressentit-il les premiers symptômes?	(2) De quoi se plaignait-il?
11	H... (militaire).	Bovington.	Se plaint de maux de tête, après une marche de nuit, le 9 janvier. Tombé malade le 12 janvier. Admis à l'hôpital militaire le 19 janvier.	Maux de tête, torpeur, ri[...]gidité du cou.
12	Bt... (militaire).	Swansea, Pays de Galles (?).	Se sentit mal dans le train de nuit de Swansea à Poole, devant arriver à Poole à 4 heures du matin le 23 janvier.	Violent mal de tête [...] douleurs générales.
13	C... (militaire).	Bovington.	Le 4 février.	Douleurs dans tout le corp[s] mais principalement dans [l]a tête et dans la nuque.
14	Bc... (militaire).	Sherborne.	Le 7 février.	Maux de tête et trembl[e]ments.
15	Cs... (militaire).	Bovington.	Le 11 février.	Forcé de cesser l'exerci[ce] le matin du 11 : diarrhé[e] malaise général comme alla[nt] avoir la grippe.
16	By... (militaire).	»	Le 11 février.	Rhume et mal à la gorg[e] jusqu'au 11 février, quand [le] mal de tête commença.
17	Dy... (militaire).	Bovington.	Le 11 février.	Maux de tête, vomissement[s] photophobie, rigidité.
18	Ef... (militaire).	»	Le 11 février.	Diarrhée, vomissements [...] rétraction de la tête.
19	Hd... (militaire).	»	Le 12 février au matin. Bien portant le 11 février, sauf un rhume.	Mal de tête et douleu[rs] générales.
20	G... (militaire).	»	Le 15 février.	Maux de tête, maux d[e] gorge.

IJ DÉBUT DE LA MALADIE ɪnseignements		OBSERVATIONS	TRAITEMENT AU SÉRUM ANTI-MÉNINGOCOCCIQUE — Évolution
(3) Avait-il ɪl à la gorge avant?	Source des renseignements		
—	Écrit du malade et Archives.	Vu par moi pour la première fois le 26 janvier.	Guérison.
Pas de sounance; seuleɜnt mal à la rge le 24 janɜr.	Rapporté par sa femme.	—	Mort le 29 janvier.
Oui.	Écrit du malade et rapport de ses camarades.	Selon ses camarades, il fut malade toute la journée du 3 février, pensant avoir l'*influenza*. Admis à l'hôpital le 4 février.	Guérison.
—	Écrit du père.	—	Mort le 15 février.
Non.	Rapport personnel du malade.	—	Guérison.
Oui, voir (2).	Écrit du malade.	—	Guérison.
Oui, deɪis plusieurs urs.	Rapport personnel du malade et Archives.	—	Guérison.
Non.	Rapport personnel du malade et Archives.	—	Guérison.
Non.	Écrit du malade.	—	Guérison.
Oui, voir (2).	Écrit du malade.	Début probable la veille, car il consulta le docteur pour la première fois le 15 au matin.	Guérison.

NUMÉRO DES CAS	NOMS	LOCALITÉ	QUESTIONS POSÉES POUR FIXER LA DATE avec la source des (1) Quel jour le malade ressentit-il les premiers symptômes ?	(2) De quoi se plaignait-il ?
21	Gr... (militaire).	Blandford.	Le 16 février il prit part aux exercices du matin. Admis à l'hôpital le soir à 7 heures.	Mal de dos, toute la journée et maux de tête l'après-midi.
22	Ho... (militaire).	Bovington.	Le 20 février, quitta l'exercice à 4 heures de l'après-midi, ne se sentant pas bien. Admis à l'hôpital le soir à 11 heures.	—
23	Cx... (militaire).	Bovington.	Le 21 février.	Mal à la gorge et maux de tête.
24	T... (militaire).	»	Pas exactement connu. Admis à l'hôpital militaire le 15 février, se plaignant simplement de mal de gorge. Symptômes de méningite seulement le 21 février.	Vomissements, torpeur, rigidité des muscles, rétraction de la tête et éruption.
25	S... (militaire).	»	Porté malade à la visite du 22 février. Admis à l'hôpital militaire le 23.	Maux de tête, vomissement et rétraction de tête.
26	Tr... (civil).	Swanage.	Le 21 février.	Maux de tête, rhume, toux mal de gorge, vomissements
27	M... (militaire).	Weymouth.	Admis à la « salle de garde » militaire comme « ivre » le soir du 22 février. Porté malade à la visite du 23, et admis à l'hôpital militaire le 25, où je le vis plus tard dans la journée.	Etat subcomateux, raideur de la nuque.
28	Bn... (militaire).	Bovington.	Admis à l'hôpital militaire le 14 février, souffrant de mal de gorge. Premiers symptômes nets de méningite le 23 février.	Mal de tête, vomissements torpeur, attitude caractéristique.
29	Ch... (militaire).	»	Admis à l'hôpital militaire le 16 février, souffrant de mal de gorge. Premiers symptômes nets de méningite le 26 février.	Maux de tête, vomissements, torpeur, rigidité, éruption et attitude caractéristique.

ᴵU DÉBUT DE LA MALADIE enseignements		OBSERVATIONS	TRAITEMENT AU SÉRUM ANTI-MÉNINGOCOCCIQUE — Évolution
(3) Avait-il mal à la gorge avant ?	Source des renseignements		
Non.	Rapport personnel du malade.	—	Guérison.
—	Archives.	—	Mort le 22 février.
Oui, voir (2).	Rapport personnel du malade.	—	Guérison.
Oui, voir (2).	Archives.	Admis le 15 dans la même salle d'hôpital où Hd... et By... avaient été gardés jusqu'au 21 février.	Mort le 22 février.
—	Rapport des camarades et Archives.	Début probable le 21 février.	Mort le 26 février.
Oui, voir (2).	Écrit de sa fille.	—	Mort le 26 février.
—	Notes de laboratoire.	Première ponction lombaire le 25 février. Début probable le 21-22 février.	Guérison.
Oui, voir (2).	Archives.	A l'hôpital militaire, il occupait la même salle que T...	Mort le 26 février.
Oui, voir (2).	Archives.	Admis dans la même salle d'hôpital qu'occupait Bn...	Guérison.

NUMÉRO DES CAS	NOMS	LOCALITÉ	QUESTIONS POSÉES POUR FIXER LA DATE avec la source des (1) Quel jour le malade ressentit-il les premiers symptômes ?	(2) De quoi se plaignait-il ?
30	Da... (militaire).	Bovington.	Avait un rhume depuis une semaine. Se plaignait de raideurs dans les jambes le 26 février au soir. Admis à l'hôpital le 28 février.	Maux de tête, douleurs de jambes, éruption siégeant par tout le corps.
31	Ph... (militaire).	»	S'éveillait malade le matin du 27 février. Transporté à l'hôpital le 28.	Presque sans connaissance au moment de l'admission.
32	Mn... (militaire).	Londres.	Quitta Weymouth en bonne santé pour aller à Londres le 26 février pour 3 jours en permission. Sentit mal à la gorge le 27. De retour le 28 à 10 h. 30 du soir, se plaignit de douleurs qu'il attribua au *rhumatisme*.	Douleurs générales, raideur et maux de tête. Vertiges.
33	Ct... (civil).	Sherborne.	Vu par le docteur pour *rougeole* le 1er mars. Vu encore le 5 mars, appelé d'urgence.	Mal de tête, fièvre, frissons,
34	Sn... (militaire).	Bovington.	Le 2 mars.	Douleurs dans les articulations, ne pouvant pas marcher.
35	P... (infirm.).	Weymouth.	Le 3 mars.	Céphalalgie atroce, frissons, douleurs dans les jambes.
36	K... (militaire).	Bovington.	Admis à l'hôpital militaire le 7 mars à 3 heures de l'après-midi.	Douleur dans l'aine gauche. Perte de connaissance une demi-heure après son admission. Crises convulsives et vomissements.
37	Dm... (civile).	Poole.	Le matin 8 mars.	Maux de tête, raideur de la nuque, mal de gorge.
38	Bs... (militaire).	Bovington.	Admis à l'hôpital militaire le 12 mars.	Doul. dans tout le corps mais principalement dans le dos.
39	L... (militaire).	Wareham.	Admis à l'hôpital militaire le 18 mars, mais se sentait très malade depuis au moins une semaine.	

DU DÉBUT DE LA MALADIE renseignements		OBSERVATIONS	TRAITEMENT AU SÉRUM ANTI-MÉNINGOCOCCIQUE — Évolution
(3) Avait-il mal à la gorge avant ?	Source des renseignements		
—	Rapports des camarades et Archives.	Malgré sa raideur des jambes, il sortit le soir du 27 pour aller à l'église. Début probable le 26 février.	Mort le 6 mars.
—	Rapports des camarades et Archives.	Début probable le 26-27 février.	Mort le 1er mars.
Oui, voir (1).	Rapport personnel du malade.	—	Guérison.
Seulement le mal de gorge associé à la rougeole.	Rapport de son médecin.	Début probable le 1er-2 mars.	Guérison.
Oui, depuis 15 jours.	Écrit du malade.	—	Guérison.
Non.	Écrit de la malade.	—	Guérison.
—	Archives.	—	Guérison.
Oui, voir (2).	Rapporté par sa mère.	—	Morte le 21 mai.
—	Archives.	—	Mort le 16 mars.
	Rapport de l'O. C. 11 Devon Regt.	Début probable vers le 13 mars.	Mort le 26 mars.

NUMÉRO DES CAS	NOMS	LOCALITÉ	QUESTIONS POSÉES POUR FIXER LA DATE avec la source des (1) Quel jour le malade ressentit-il les premiers symptômes ?	(2) De quoi se plaignait-il ?
40	Mi... (militaire).	Bovington.	Le 14 mars.	Maux de tête atroces, douleurs au travers des épaules et le long du dos, violents vomissements.
41	Br... (militaire).	Blandford.	Le 15 mars.	Mal de tête, douleurs dans le dos.
42	Dw... (militaire).	Wareham.	Le 21 mars il se plaignait d'un rhume et crachait du sang. Il pensait avoir l'*influenza*. Le 22 et le 23 il était très malade. Le 24, il ne peut pas se mettre debout et on le transporta à l'hôpital militaire.	Toux, douleurs dans tout le corps, mais principalement dans les jambes.
43	Em... (civil).	Weymouth.	Le 26 mars, vu pour la première fois par le docteur le 27 mars.	Ne se plaignait pas, me semblait lourd.
44	Cy... (militaire).	Bovington.	Tomba malade le 27 mars, pire le 28, passe à la visite le 29.	Douleurs dans la nuque et le long de la colonne vertébrale.
45	Ha... (militaire).	Weymouth.	Jouait du football l'après-midi du 28 mars, étant convalescent de la *roséole épidémique*. Tomba subitement malade le même soir et délirait à minuit.	Semi-comateux, avec prunelles dilatées et yeux déviés vers la droite. Pas de rétraction de la nuque.
46	Sh... (militaire).	Bovington.	Le 30 mars.	Mal de tête et de gorge.
47	He... (militaire).	Wareham.	L'après-midi du 3 avril, lorsqu'il faisait de la bicyclette.	Sentiment de fatigue et raideur, ressentis pour la première fois en descendant de sa bicyclette pour gravir une côte.
48	Eo... (militaire).	Cornouaille.	Ayant une permission, quitta Wareham le 5 avril pour la Cornouaille. Passa la nuit dans la salle d'attente de la gare de Guinear Road. Arriva chez lui le 6 au matin.	Maux de tête, perte de connaissance le soir du 7.

DU DÉBUT DE LA MALADIE renseignements		OBSERVATIONS	TRAITEMENT AU SÉRUM ANTI-MÉNINGOCOCCIQUE — Évolution
(3) Avait-il mal à la gorge avant?	Source des renseignements		
Pas immédiatement.	Écrit du malade.	—	Guérison.
Oui.	Écrit du malade.	—	Guérison.
—	Rapport de ses camarades.	—	Mort le 31 mars.
Non.	Écrit de son père.	—	Mort le 10 avril.
—	Rapports de ses camarades et Archives.	Début probable le 27-28 mars.	Mort le 2 avril.
—	Rapport du médecin.	—	Mort le 1er avril.
Oui, voir (2).	Écrit du malade.	—	Guérison.
Non.	Rapport personnel du malade et écrit du malade.	—	Guérison.
Avait mal à la gorge déjà le matin du 5 en quittant Wareham.	Rapport du médecin et de ses camarades.	Vu par le docteur pour la première fois le 7 avril. Début probable le 6-7 avril.	Guérison.

NUMÉRO DES CAS	NOMS	LOCALITÉ	QUESTIONS POSÉES POUR FIXER LA DATE avec la source des	
			(1) Quel jour le malade ressent-il les premiers symptômes?	(2) De quoi se plaignait-il?
49	B... (civile).	Weymouth.	Le 12 avril.	Douleurs dans le dos qui finissaient dans l'estomac et migraine.
50	Sl... (militaire).	Bovington.	Admis à l'hôpital militaire le 13 avril.	Céphalée frontale, douleurs sur tout le corps. Pendant la nuit vomissements, sentiment d'angoisse et accroissement de raideur de la nuque. Rétraction de la tête.
51	F... (militaire).	Blandford.	Le 15 avril.	Mal de tête intense.
52	Rn... (militaire).	Wareham.	Le 16 avril.	Malaise général, surtout mal de tête.
53	Wh... (militaire).	Weymouth.	Le 17-18 avril.	Raideur de la nuque, frisson. Esprit lucide.
54	Hs... (militaire).	Blandford.	Admis à l'hôpital le 21 avril.	Vomissements, mal de tête, douleurs générales.
55	St... (militaire).	Wareham.	Dans la nuit du 30 avril au 1er mai.	Douleurs dans la nuque, mal de tête atroce et vomissements.
56	Al... (militaire).	»	Se plaignait du mal de tête le soir du 2 mai, tombe dans le coma le lendemain et est transporté à l'hôpital.	Voir (1).
57	Re... (militaire).	Swanage.	Le 10 mai.	Douleurs dans la tête, le dos et les membres inférieurs. Pas de rétraction de tête, mais difficulté de pencher en avant. Mal de gorge. Eruption purpurique étendue.
58	Sm... (militaire).	Wareham.	Le 13 mai.	Douleurs dans les membres inférieurs, vomissements.
59	Bg... (militaire).	Bovington.	Le 28 mai.	Mal de tête et douleurs dans le dos.

U DÉBUT DE LA MALADIE nseignements		OBSERVATIONS	TRAITEMENT AU SÉRUM ANTI-MÉNINGOCOCCIQUE — Évolution
(3) Avait-il ıal à la gorge avant?	Source des renseignements		
Non.	Écrit de la malade.	—	Guérison.
—	Archives.	Début probable le 12 avril.	Guérison.
Oui, environ jours.	Écrit du malade.	—	Guérison.
Non.	Écrit du malade.	—	Guérison.
Non.	Archives.	Vu par moi pour la première fois le matin du 18 avril.	Guérison.
—	Archives.	Début probable le 20 avril.	Mort le 27 avril.
Non.	Écrit du malade.	—	Guérison.
—	Rapport de ses camarades.	Début probable le 2-3 mai.	Mort le 6 mai.
Oui, voir (2).	Rapport du malade.	Début probable le 9 mai.	Mort le 13 mai.
Non.	Écrit du médecin.	—	Guérison.
Non.	Écrit du malade.	—	Guérison.

NUMÉRO DES CAS	NOMS	LOCALITÉ	QUESTIONS POSÉES POUR FIXER LA DATE DU DÉBUT DE LA MALADIE avec la source des renseignements				TRAITEMENT AU SÉRUM ANTI-MÉNINGOCOCCIQUE — Évolution
			(1) Quel jour le malade ressentit-il les premiers symptômes ?	(2) De quoi se plaignait-il ?	(3) Avait-il mal à la gorge avant ?	Source des renseignements.	
60	Ro... (milit.)	Bovington.	Admis à l'hôpital militaire le 4 juin ayant une éruption purpurique, mais souffrant déjà depuis 2 ou 3 jours.	Voir (1).	—	Rapports de ses camarades et Archives.	Mort le 11 juin.
61	Hn... * (milit.)	»	Quitta l'exercice l'après-midi du 21 juin. Porté malade à la visite du lendemain matin.	Malaise, mal de tête, douleurs dans le dos et la nuque.	Non.	Écrit du malade.	Guérison.
62	Co... (milit.)	»	Admis à l'hôpital ayant de la température le 28 juin.	Rhume, mal de tête et frissons.	—	Rapports de ses camarades.	Mort le 8 juillet.

* Ce soldat occupait un lit, près d'une table, sous laquelle les balais et les toiles mouillées servant à laver le plancher du baraquement restaient en permanence. Début probable le 21-22 juin.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

32e ANNÉE AVRIL 1918 N° 4

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de E. Metchnikoff.

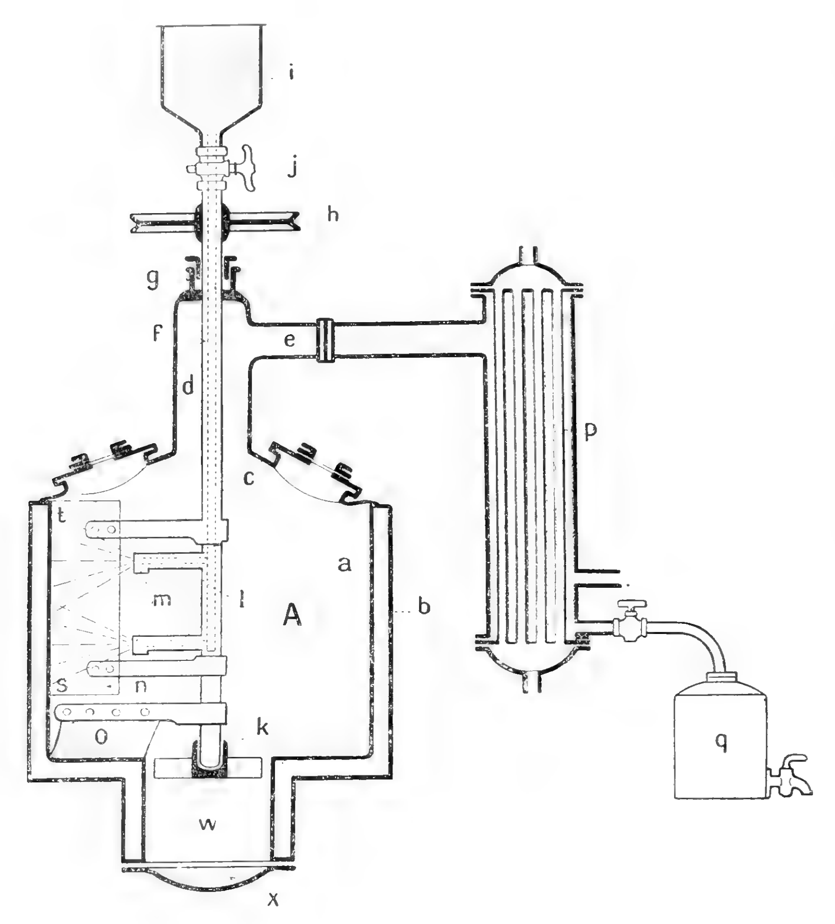
NOUVEL APPAREIL POUR LA DESSICCATION OU LA CONCENTRATION DES LIQUIDES A BASSE TEMPÉRATURE

par LOUIS MARMIER,

Sous-directeur de l'Institut Pasteur de Lille.

Beaucoup de liquides, parmi lesquels des produits d'origine animale ou végétale, tels que albumines, sérums, moûts, etc., ne peuvent être portés à l'ébullition, à la pression atmosphérique, et même souvent ne peuvent être chauffés à des températures de 60° environ, sans subir des altérations plus ou moins profondes. Pour certains sérums et produits organiques, on est même obligé de ne pas dépasser une température comprise, suivant les cas, entre 37 et 50°, sous peine de leur faire perdre leurs propriétés. D'autre part, à leur état normal, ces produits s'altèrent facilement et il est important, soit pour leur étude, soit pour leur conservation avec toutes leurs propriétés, de pouvoir les dessécher ou les concentrer rapidement. C'est pour permettre de faire cette dessiccation ou cette concentration à basse température que nous avons établi, avec le concours de M. Canonne, constructeur à Lille, l'appareil suivant :

Le dessiccateur se compose d'un espace clos *A*, entouré à une petite distance d'une enveloppe *b*. Dans l'intervalle, entre les parois *a* de *A* et *b*, circule de l'eau chaude (ou un autre

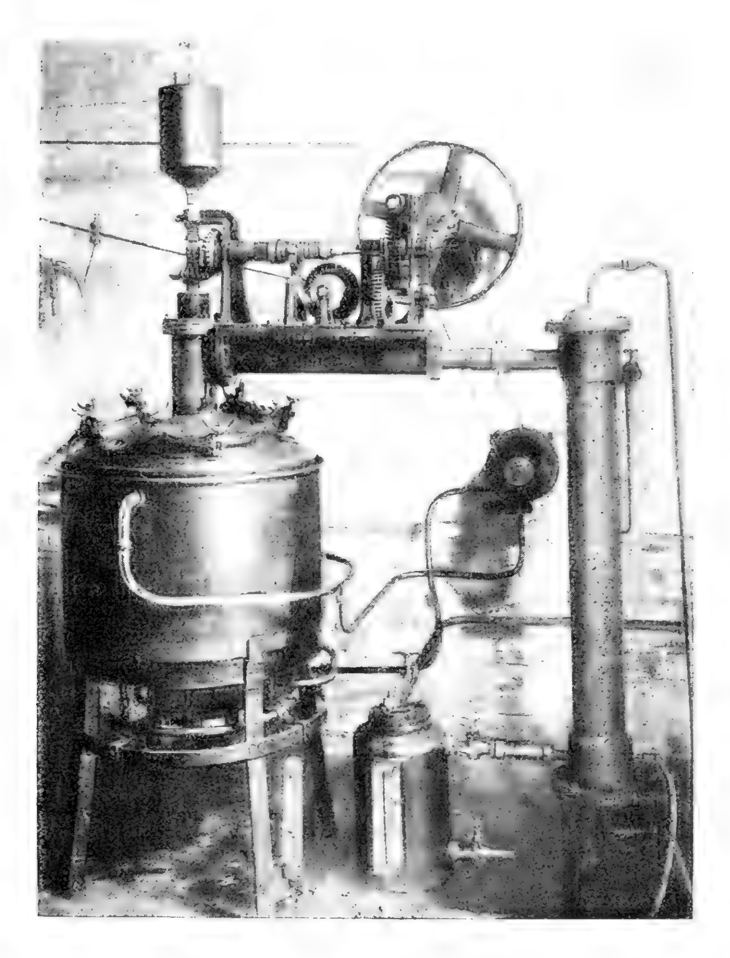


Coupe de l'appareil
pour la dessiccation des liquides à basse température.

fluide convenable) maintenue à une température telle que la limite dangereuse pour les propriétés du produit traité ne soit pas franchie.

La paroi supérieure *c* de l'espace clos *A* porte en son centre un tube d'évacuation en relation avec un condenseur *p*. Celui-ci sera, par exemple, un condenseur tubulaire dont les tubes

seront refroidis intérieurement par circulation d'eau. Les vapeurs dégagées dans le récipient *A* se condensent à l'extérieur des tubes, et le liquide ainsi obtenu s'écoule dans un



Vue de l'ensemble du dessiccateur à basse température (sauf la pompe à vide).

réservoir *q*. Une pompe à vide fait un vide convenable dans tout l'appareil.

Un arbre creux *f* pénètre dans l'espace clos *A* à travers un presse-étoupe étanche *g* et repose, à la partie inférieure de *A*, sur un pivot *k*. Extérieurement à *A*, l'arbre porte une poulie *h*

ou un pignon denté qui lui communiquera un mouvement de rotation pendant la marche de l'appareil, puis se termine par un réservoir *i* dans lequel on verse le liquide à traiter. Ce réservoir est en communication avec l'intérieur de l'arbre, un robinet *j* permet d'interrompre cette communication.

Un ou plusieurs petits tubes *l*, fixés sur l'arbre et communiquant avec sa partie creuse, sont terminés chacun par un pulvérisateur *m* projetant le liquide et le répartissant en pluie de très fines gouttelettes sur la paroi du récipient *A* qui se trouve en regard. Une raclette *n* est montée sur l'arbre et sera entraînée par lui dans son mouvement de rotation. Elle touche la paroi cylindrique, suivant une génératrice précédant la surface couverte par le jet des pulvérisateurs. A la partie inférieure, se trouve une autre raclette *o*, ayant une inclinaison convenable pour ramener le produit desséché dans un récipient *w*, d'où on l'évacue à la fin de l'opération par le tampon inférieur *x*.

L'appareil fonctionne de la façon suivante :

Le bain-marie étant à une température convenable, on ferme le robinet *j*, et on fait le vide dans l'appareil. On remplit le réservoir *i* du produit à dessécher ou à concentrer et on met l'arbre en rotation. Quand on ouvre *j*, la pression atmosphérique chasse le liquide dans l'arbre creux et dans les pulvérisateurs, qui le projettent en pluie fine sur la paroi chauffée. Là, le liquide est étalé en une couche mince qui s'évapore rapidement. Les pulvérisateurs étant entraînés par le mouvement de rotation de l'arbre, le jet en pluie couvre toute la paroi cylindrique sur une hauteur *st*. Le débit des pulvérisateurs et la vitesse de rotation sont réglés de telle sorte que le produit déposé sur la paroi est parvenu au degré de siccité ou de concentration désiré avant un nouveau passage des pulvérisateurs. De cette façon, la raclette *n* ne détache de la paroi qu'un produit à l'état convenable. Ce produit tombe sur le fond du récipient, d'où la raclette *o* le conduit à l'intérieur du magasin *w*.

Pour de très faibles débits, on est amené à employer des pulvérisateurs ayant un orifice infime, par conséquent susceptible d'être obturé par des petites particules solides pouvant rester en suspension dans le liquide. Cet inconvénient est évité en donnant au pulvérisateur un orifice suffisant pour qu'il n'y ait

plus de risque d'obturation. Il s'ensuit une augmentation de débit, et par suite le produit ne pourrait être amené à l'état désiré pendant une révolution de l'arbre. Pour obtenir quand même, dans ces conditions, le produit à l'état voulu, on dispose sur l'appareil un mécanisme tel qu'après une révolution l'arbre s'arrête, et le jet de liquide à travers les pulvérisateurs cesse un peu avant l'arrêt de l'arbre. Après un certain temps, suffisant pour que le produit déposé sur les parois ait été évaporé au degré cherché, le mécanisme remet l'arbre en mouvement pour une nouvelle révolution et ouvre le conduit des pulvérisateurs.

Que l'appareil soit à mouvement continu ou à mouvement discontinu, en partant d'un liquide donné, on a toujours un produit final identique à lui-même, pour une même température et un même degré de vide du dessiccateur.

Dans un appareil ainsi construit, nous avons concentré de grandes quantités de moûts de raisins frais. Une fois convenablement concentrés, les moûts, sans aucune stérilisation préalable, se conservent inaltérés pendant plusieurs années.

Cet appareil nous a permis également de concentrer des sérums glycérinés et de dessécher des quantités de lait, de sérum, de sang, etc.

Ces concentrations ou dessiccations ont été faites à des températures de 36 à 45° pour le bain-marie, suivant les produits. Il importe de remarquer que, par suite de l'évaporation intense du liquide, le produit traité est à une température beaucoup plus basse, environ 20 à 26°, pendant son séjour sur la paroi.

ÉTUDES SUR LES MÉNINGOCOQUES
ET LES SÉRUMS ANTIMÉNINGOCOCCIQUES

par M. NICOLLE, E. DEBAINS et C. JOUAN.

(PREMIER MÉMOIRE)

Nous nous proposons de faire connaître ici une partie de nos recherches, laissant de côté ce qui est définitivement établi par les travaux classiques.

MÉNINGOCOQUES

Nous n'avons rien observé de nouveau, en matière de caractères morphologiques, mais nous ferons quelques remarques quant aux *caractères de culture* des méningocoques, à leur *action sur les sucres*, à leur *isolement* et à leur *conservation*.

CARACTÈRES DE CULTURE

MILIEUX SOLIDES

Nous utilisons la gélose-Martin sérum (formolé) comme milieu d'isolement et la « gélose T » comme milieu habituel.

Préparation de la gélose-Martin sérum (formolé). — On ajoute, à 500 cent. cubes de sérum équin, 1 cent. cube de formol du commerce; on mêle: on verse, après quelques instants, 1 cent. cube d'ammoniaque (22° Baumé) pour neutraliser le formaldéhyde; on étend de 2 parties d'eau *distillée* et on stérilise, pendant 1/4 d'heure, dans l'autoclave (110°). — Quand on ajoute à la gélose Martin 1/3 de sérum formolé, on n'ajoute en réalité que 1/9 de sérum originel, ce qui suffit d'ailleurs amplement.

Préparation de la « gélose T ». — Dans 1 litre d'eau, chauffée vers 80°, on dissout 40 grammes de peptone Chapoteaut, 5 grammes de sel et 2 grammes de glucose. On ajoute 20 grammes de gélose, on alcalinise, on porte à l'autoclave, on filtre, répartit et stérilise. Puis on laisse, pendant quelques jours, sans capuchonner, pour se débarrasser de l'eau de condensation.

Sur gélose T, après 24 heures (37°) : colonies arrondies, humides, légèrement surélevées, de couleur grisâtre. Lorsqu'on triture ces colonies avec le fil de platine, elles prennent, au contact de l'air, un ton saumoné.

Sur gélose-ascite : même aspect, mais développement moins énergique.

Si l'on désire bien connaître l'aspect « macroscopique » des méningocoques, il convient de les examiner sous la masse de plusieurs grammes. C'est ce qui arrive quand on prépare en grand des corps microbiens, pour immuniser les chevaux.

On s'aperçoit, alors, que les divers échantillons présentent des variétés d'abondance et de consistance très marquées. Certains sont semi-liquides, d'autres crémeux, d'autres enfin assez consistants. Ces derniers deviennent rapidement « élastiques », parfois après 24 heures d'étuve. — Les méningocoques, sauf lors de transformation « élastique », s'émulsionnent bien; mais, à poids égal de germes, les émulsions apparaissent plus ou moins opaques, selon qu'il s'agit de spécimens plus ou moins autolysables. — Mentionnons, encore, l'odeur des cultures, qui rappelle en même temps la corne brûlée et les ammoniaques composées.

MILIEUX LIQUIDES

Nous n'employons que le milieu suivant, préconisé simultanément par Salimbeni et d'Hérelle, pour le pneumocoque, et par l'un de nous (Jouan), pour le méningocoque. Nous l'appellerons « milieu MM » (Martin-méningocoque).

Préparation du milieu MM. — On fait digérer, pendant 7-8 heures (pas davantage), à 50°, des estomacs de porc dégraissés et hachés, comme pour la préparation de la peptone Martin. L'eau est d'abord portée vers 55°; on ajoute, ensuite, par litre, 10 cent. cubes d'HCl pur (22° Baumé) et, en agitant, 300 grammes de hachis d'estomac. On règle la température vers 50°. Après 7-8 heures, on monte jusqu'à 80°-90°, afin de détruire la pepsine et d'arrêter la digestion. La peptone, ainsi obtenue, se conserve, sans précautions, pendant plusieurs semaines; les moisissures, qui s'y développent éventuellement, n'altèrent point ses propriétés.

Pour fabriquer le milieu MM, on rend la peptone légèrement alcaline (tournesol) et on précipite à 120°. On filtre sur papier mouillé, on ajoute 2 grammes de glucose et on stérilise vers 112°-115°.

Les méningocoques que l'on vient d'isoler sur gélose-sérum (formolé) et, *a fortiori*, les germes déjà entraînés sur gélose T, poussent très facilement au sein du milieu MM et y donnent une culture ordinairement riche. Comme ce sont des microbes fort aérobies, ils végètent plus rapidement dans les flacons et en couche mince que dans les tubes et en couche haute ; ils y vivent aussi moins longtemps. L'aérophilie se manifeste, dans les flacons, par un anneau adhérent aux parois et, dans les tubes, par un voile, quelquefois hâtif, régulièrement présent après plusieurs jours.

L'abondance habituelle des cultures de 24 heures en milieu MM rappelle celle des cultures typhiques de même âge en bouillon-Martin. Le développement (tubes) se continue pendant 6 jours environ et la vie persiste près de 2 semaines.

ATTAQUE DES SUCRES

Nous avons étudié, à ce point de vue, nombre d'échantillons, utilisant tantôt la gélose-ascite, tantôt le milieu MM (sans glucose). Ce dernier milieu convient tout particulièrement pour deux raisons : il est d'une préparation et d'un maniement très faciles — il est presque incolore, ce qui permet d'apprécier le moindre virage du tournesol.

On ajoute au milieu MM (*flacons*) soit du glucose, soit du maltose, soit du lévulose (1,5 p. 100 de sucre, dans chaque cas) et de la teinture de tournesol très sensible. Il importe de mettre toujours à l'étuve un flacon témoin, tournesolé et non ensemencé.

La presque totalité de nos méningocoques attaquent le *glucose* et, plus énergiquement encore, le *maltose* (quel que soit le « type antigène » de ces germes). 5 échantillons n'attaquent que le glucose (3 A et 2 B — voir plus loin le sens de ces lettres). Un seul n'attaque que le maltose (type A).

La décomposition du *lévulose* n'est jamais appréciable sur gélose-ascite ; elle s'observe (grâce au caractère quasi incolore du liquide) en milieu MM, pour les 2/3 des germes étudiés. Mais l'acidification demeure légère et fait rapidement place à une alcalinité croissante, dont l'intensité, très marquée, s'apprécie par comparaison avec le flacon témoin.

ISOLEMENT

[Nous n'envisagerons que le cas des liquides céphalo-rachidiens.]

L'isolement sur gélose-sérum (formolé) doit demeurer la règle ; on étalera abondamment le culot de centrifugation à la surface du milieu.

L'isolement (ou mieux, la culture en masse) dans le liquide MM offre de grands avantages et doit être conseillé comme moyen associé.

Le premier développement *in vitro* des méningocoques exige, on le sait, la présence d'albuminoïdes. Rien de plus facile que de réaliser cette condition, en mêlant 1 partie de liquide céphalo-rachidien (non centrifugé) et 2 parties de milieu MM. Il est préférable, naturellement, de faire le mélange au lit du malade. Nous conseillons, aussi, d'incliner dans l'étuve le tube ensemencé, afin d'obtenir, par une bonne aération, la croissance rapide des germes. Celle-ci s'effectue après 16-18 heures et la culture obtenue permet l'identification directe des microbes et de leur type (par l'agglutination).

Le milieu MM, comparé à la gélose-sérum (formolé), offre un avantage et un inconvénient. *Avantage.* Lorsque les germes sont rares, ils risquent, sur la gélose-sérum, de ne pas fournir de colonies ou d'en fournir très peu, étant donnée leur situation, soit au sein des leucocytes, soit au sein des dépôts fibrineux, laquelle les isole du milieu. Dans le liquide MM, par contre, ils se trouvent rapidement libérés et croissent sans entraves, en présence de matières nutritives abondantes : d'où un pourcentage plus élevé de résultats positifs. *Inconvénient.* Si d'autres microbes coexistent avec les méningocoques, s'il se produit des contaminations fortuites, la culture, mixte, deviendra impropre au diagnostic attendu. — Par conséquent, les deux méthodes d'isolement seront avantageusement associées, comme nous le disions.

CONSERVATION

Nous conseillons le procédé suivant. On prend de gros tubes à essai (diamètre : 2,5 centimètres) et on y verse de la gélose Martin, qui est transformée en gélose-sérum (formolé). Sur le

culot, assez haut (5-6 cm.), on dépose une anse de germes, *sans trop entamer le milieu*. On étale, afin d'obtenir, au centre de la surface libre, un disque d'épaisseur égale et on porte dans l'étuve (37°). Les microbes manifestent leur développement par l'extension du disque, qui gagne la paroi et par sa surélévation progressive. Ils demeurent vivants pendant 2 mois en général; les repiquages mensuels suffisent toujours.

Pour l'envoi des méningocoques, voici ce qu'il convient de faire. On fond un tube de gélatine; on émulsionne abondamment des germes jeunes dans le milieu; on refroidit; on scelle ou on capuchonne.

Considérés au point de vue de leurs « caractères généraux » (morphologie, aspect des cultures, propriétés biologiques), les méningocoques offrent des traits communs, que chacun connaît aujourd'hui et des différences individuelles. Ces différences, légères et sans relation entre elles, ne permettent pas de créer des groupes distincts. Nous allons montrer que les méningococciques, envisagés au point de vue de leurs « caractères antigènes », manifestent, par contre, des dissemblances marquées et concordantes, imposant l'idée de types tranchés.

SÉRUMS ANTIMÉNINGOCOCCIQUES

Lorsque la question des sérums antiméningococciques s'est trouvée assez avancée, on a remarqué que l'effet des sérums, soit *in vitro*, soit *in vivo*, ne s'exerçait pas indifféremment sur tous les échantillons. Le sérum, préparé avec un germe donné, n'en agglutinait que certains autres; il ne guérissait aussi que certaines méningites. D'où la notion de « types antigènes », formulée par Elser et Huntoon, Dopter, Arkwright, Gordon, Ellis.

Nous avons reconnu le bien-fondé de cette notion et nous établirons qu'il existe, actuellement, à notre connaissance, 4 types de méningocoques, aisément reconnaissables au moyen de l'agglutination.

On envisagera, successivement : l'*immunisation des chevaux*, l'*agglutination* des méningocoques et la *réaction de Bordet-*

Gengou, appliquée à l'étude de ces germes et des sérums correspondants.

IMMUNISATION DES CHEVAUX

Nous avons immunisé des chevaux dans le but d'obtenir des sérums jouissant du pouvoir agglutinant et du pouvoir thérapeutique. Le pouvoir thérapeutique ne va pas toujours de pair avec le pouvoir agglutinant et *vice versa*.

On se contentera d'indiquer brièvement les méthodes suivies; elles seront décrites en détail, lorsque nous publierons, avec nos dévoués collaborateurs Frasey et Nicolas, l'histoire complète des animaux immunisés.

Ici, comme ailleurs, nous avons exclusivement employé des « antigènes morts » : le plus souvent, des germes tués par l'alcool-éther; parfois, des extraits microbiens obtenus par le procédé Rowland, au sulfate de soude anhydre (1).

Nous ne saurions trop remercier notre ami Dujardin-Beaumetz, qui nous a fourni *toutes les cultures* utilisées pour préparer les antigènes.

Trois méthodes ont été suivies parallèlement. Voici leurs caractéristiques essentielles :

1. Injections (doses croissantes) sous la peau, puis dans les veines — d'abord tous les 8 jours, ensuite tous les 15 jours. Saignées tous les 8 jours, puis tous les 15 jours.
2. Injections (doses croissantes) dans les veines; tous les 8 jours, puis tous les 15 jours. Saignées tous les 8 jours, ensuite tous les 15 jours.
3. Injections dans les veines, une fois par mois (4 jours consécutifs — doses croissantes pendant ces 4 jours). Saignées, 11 jours après la dernière des 4 injections. On augmente la dose globale d'un mois au suivant.

Les deux dernières méthodes sont incontestablement les meilleures, quand on veut obtenir rapidement des sérums thérapeutiques très actifs. Elles sont aussi les plus délicates à manier, notamment la seconde.

Au total, nous avons perdu 6 animaux sur 26; résultat fort satisfaisant, si l'on considère qu'il fallait créer de toutes pièces des procédés sûrs et efficaces d'immunisation.

(1) Voir : M. Nicolle, Debains et Loiseau. Études sur le bacille de Shiga (Ces *Annales*, août 1916).

La mort des chevaux est due à l'action de la toxine microbienne, comme chez tous les sujets traités par nous avec les antigènes bactériens les plus variés. Mais il convient de distinguer 2 éventualités, selon que cette mort survient en quelques minutes ou en quelques heures (généralement pendant la nuit suivant l'injection ultime). Dans le premier cas, il s'agit d'une hypersensibilité au regard de la toxine, car les chevaux neufs, qui reçoivent la même dose d'antigène, ne succombent *jamais* avant plusieurs heures. Dans le second cas, il s'agit d'une suspension momentanée de l'immunité antitoxique, car les chevaux neufs, qui reçoivent la même dose d'antigène, succombent *exactement* après le même laps de temps. Ce double mécanisme a été mis hors de doute par Debains et Nicolas. Nous avons trouvé que l'on évite toujours les manifestations d'hypersensibilité, en diluant convenablement l'antigène. Il n'existe aucun moyen actuel de prévenir la suspension de l'immunité antitoxique; il faudra donc s'efforcer de la prévoir (en examinant minutieusement les chevaux entre chaque injection) et l'on diminuera alors plus ou moins la dose d'antigène administrée.

Les accidents mortels dépendent de plusieurs facteurs :

Le microbe choisi. En gros, ils sont plus fréquents avec le type A qu'avec le type C et avec le type C qu'avec le type B. Mais il convient de tenir compte, surtout, de la nature propre de chaque échantillon.

L'animal traité. L'individu-cheval offre autant d'importance que l'individu-méningocoque.

La méthode employée. Nous avons dit que la seconde était la plus dangereuse; aucun doute là-dessus. Il faut noter, cependant, qu'un cheval, immunisé par la voie sous-cutanée avec un extrait microbien, a succombé en quelques minutes, lors de réinjection (toujours sous-cutanée) de cet extrait. [Comparer les observations de Behring (toxine tétanique) et de Martin (toxine diphtérique), absolument superposables.]

La forme de l'antigène? Rien de net, jusqu'ici.

ÉTUDE DE L'AGGLUTINATION

A la suite de recherches multipliées, nous avons obtenu 4 sérums agglutinants, qui ont permis de classer tous les méningocoques (sauf de rares spécimens, dont il sera question bientôt) en 4 types distincts. *Ces 4 sérums*, distribués actuel-

lement par l'Institut Pasteur, *seront dénommés sérums-réactifs* : A, B, C, D.

Le sérum A est préparé avec l'échantillon 17; le sérum B, avec l'échantillon 31; le sérum C, avec l'échantillon 18; le sérum D, avec l'échantillon 32.

Divers germes, identifiés avec eux, nous ont servi pour obtenir de nouveaux sérums, qui seront dénommés *sérums* A, B et C, *sans épithète*. Ces sérums, comme les « sérums-réactifs », jouissent, habituellement, d'un haut pouvoir thérapeutique.

Nous exposerons, tour à tour : la *préparation des suspensions microbiennes*; la *technique de l'agglutination*; les *résultats de nos expériences*, au double point de vue théorique et pratique.

PRÉPARATION DES SUSPENSIONS MICROBIENNES

On émulsionne les germes dans la solution physiologique (NaCl 1 p. 100), à raison de 1 centigramme de microbes par 20 cent. cubes de la solution.

Lorsqu'il s'agit d'une première culture, obtenue sur gélose-sérum (formolé) avec eau de condensation, on aura soin de ne pas prélever les colonies qui baignent au sein du liquide, car des traces de celui-ci peuvent entraver l'agglutination.

Lorsqu'il s'agit de cultures ultérieures, obtenues sur gélose T (sans eau de condensation), on ne court aucun risque.

Dans les deux cas, on s'adressera à des germes de 24 heures (37°) ou, mieux encore, à des germes plus jeunes. Rappelons aussi que les cultures de 16-18 heures en milieu MM conviennent très bien pour l'identification rapide des méningocoques.

TECHNIQUE DE L'AGGLUTINATION

Elle varie, selon que l'on se propose de faire simplement le diagnostic du type méningococcique et d'obtenir une réponse immédiate (précieuse, au point de vue épidémiologique et surtout thérapeutique) ou suivant que l'on désire connaître la limite exacte d'agglutination d'un échantillon donné, soit avec le sérum homologue, soit avec les sérums-réactifs, l'expérience demandant alors 24 heures.

Méthode rapide.

On verse 1 cent. cube d'émulsion dans 4 tubes et on ajoute, respectivement, 1/20 de cent. cube de chacun des sérums-réactifs A, B et C (inutile d'employer le sérum D, le type D n'ayant été rencontré jusqu'ici qu'une seule fois) et de sérum équin normal. On agite pendant quelques instants, en inclinant et redressant les tubes alternativement et on lit. Habituellement, le résultat cherché se trouve obtenu après 3-5 minutes. Dans le cas d'échantillons peu agglutinables, il faut prolonger l'agitation pendant 10 minutes environ. Dans le cas (très rare) d'échantillons hyperagglutinables (sensibles au sérum normal), on recommencera l'expérience avec 1/50 de cent. cube (exceptionnellement, 1/100) des 4 sérums.

Méthode lente.

Supposons que l'on veuille déterminer la limite d'action des 4 sérums-réactifs (A, B, C, D) et du sérum équin normal, sur un méningocoque donné. On prépare 5 groupes de 4 tubes, contenant tous 1 cent. cube d'émulsion et l'on verse, respectivement, pour chaque groupe, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200 de cent. cube de chaque sérum (il est très rare que l'on doive employer plus de 1/200 de cent. cube). On abandonne pendant 24 heures (température ordinaire) et on examine ensuite à l'œil nu (aidé de la loupe).

RÉSULTATS DE NOS EXPÉRIENCES

Avec la *méthode rapide*, le résultat, strictement qualitatif, tient à l'excès de sérum employé et à la vitesse obligée de la réaction. Toute agglutinine « non dominante » ne saurait manifester sa présence en un temps aussi court.

La *méthode lente* permet, au contraire, de pousser plus loin l'analyse des phénomènes et de résoudre les trois questions suivantes : *légitimité des types méningococciques* (révélés par l'agglutination); *leur fréquence* respective — *pouvoir agglu-*

tinogène des méningocoques — *agglutinabilité* des méningocoques.

LÉGITIMITÉ DES TYPES MÉNINGOCOCCIQUES ; LEUR FRÉQUENCE RESPECTIVE.

L'ensemble des échantillons, étudiés jusqu'ici par nous, se divise en deux groupes, suivant que les germes sont agglutinés ou non par le sérum équin normal. Nous examinerons d'abord le second groupe, seul important pratiquement.

Méningocoques inagglutinables par le sérum équin normal.

[De beaucoup les plus nombreux. Nous en avons étudié au moins 200.]

Un échantillon (D) se montre seul sensible au sérum D (sérum homologue) et sensible au seul sérum D. *D'où la notion d'un type D*, d'ailleurs exceptionnel actuellement.

7 échantillons apparaissent exclusivement sensibles au sérum-réactif C (préparé avec l'un d'eux). *D'où la notion d'un type C*, peu commun jusqu'ici.

Plus de la moitié des autres se révèlent sensibles au sérum-réactif B (ils sont toujours agglutinés à moins de 1/20 de cent. cube, habituellement à 1/100 ou 1/200). Parmi eux, 1/3 environ s'agglomèrent aussi par le sérum-réactif C (à 1/20 de cent. cube), quelques-uns par les sérums-réactifs C et A (à 1/20 de cent. cube). Ces agglutinations adventices évoluent plus lentement que l'agglutination dominante et nécessitent, pour se produire, une plus forte dose de sérum. *D'où la notion d'un type B*, très fréquent.

Moins de la moitié des autres se montrent sensibles au sérum-réactif A (ils sont toujours agglutinés à moins de 1/20 de cent. cube, habituellement à 1/100 ou 1/200). Parmi eux, 1/3 environ s'agglomèrent aussi par le sérum-réactif C (à 1/20 de cent. cube), un seul échantillon par les sérums C et B (à 1/20 de cent. cube). Ces agglutinations « mineures » progressent moins vite que l'agglutination « majeure » et ne sont obtenues qu'avec une quantité plus grande de sérum. *D'où la notion d'un type A*, très fréquent.

Méningocoques agglutinables par le sérum équin normal.

C'est-à-dire exceptionnellement agglutinables. Nous n'en avons rencontré que peu d'échantillons.

Lorsque l'action d'un des sérums reste dominante et que l'action des autres se rapproche de celle du sérum normal jusqu'à l'égaler éventuellement, le diagnostic ne souffre pas de réelle difficulté. *Exemples.*

N° 83. — Agglutiné par le sérum B à 1/100 de cent. cube, par les sérums A, C et N (normal) à 1/20. — *C'est un B.*

N° 104. — Agglutiné par le sérum B à 1/200 de cent. cube, par les sérums A, C et N à 1/50. — *C'est un B.*

N° 67. — Agglutiné par le sérum B à 1/200 de cent. cube, par les sérums A, C et N à 1/100. — *C'est un B* (quantitativement très agglutinable, qualitativement fort peu).

N° 61. — Agglutiné à 1/200 de cent. cube par le sérum B, à 1/100 par le sérum C, à 1/10 par les sérums A et N. — *C'est un B.*

N° 26. — Agglutiné à 1/2.000 de cent. cube par le sérum B, à 1/500 par le sérum C, à 1/100 par le sérum A, à 1/50 par le sérum N. — *C'est un B.*

(Nous ne parlons pas ici du sérum D, qui se comporte *toujours* comme un sérum normal, sauf vis-à-vis de l'échantillon D.)

Lorsque deux sérums spécifiques exercent la même action, le type demeure indéterminé. *Exemple.*

N° 74. — Agglutiné par les sérums A et C à 1/200 de cent. cube, par le sérum B à 1/100, par le sérum N à 1/50.

(On pourrait tenter de lever l'indétermination en préparant des sérums avec de tels échantillons et en étudiant leurs propriétés sur des méningocoques des divers types.)

En résumé, la majorité des méningocoques, étudiés par nous, appartient soit au type A, soit au type B. Ces deux types offrent à peu près la même importance moyenne, mais tel d'entre eux pourra prédominer suivant le moment et le lieu (le type B prédomine nettement, ici, depuis plusieurs mois).

Ellis admet, également, deux types principaux. Nous avons pu nous assurer, avec lui, que nos méningocoques A correspondent à ses méningocoques I et nos méningocoques B à ses méningocoques II.

D'après Gordon, il existe 4 groupes, dont 2 plus fréquents

(I et II). Nous avons eu entre les mains plusieurs représentants de ces groupes, grâce à l'obligeance de notre savant collègue. Comparons, pour ces germes, le « diagnostic Gordon » avec le nôtre.

ÉCHANTILLONS	DIAGNOSTIC GORDON	DIAGNOSTIC porté PAR NOUS
Jordan	Type I	Type A
Howes	— I	— A
Mac Phail	— II	— B
Foster	— II	— B
Cuff.	— II	— B
Offord	— II	— B
Bunting	— III	— A
Wigglesworth	— IV	— B
P. 5	— IV	— B

(Mac Phail = N° 26 ; P. 5 = N° 104 — échantillons anormalement agglutinables étudiés plus haut.)

Nous avons préparé des sérums, en immunisant les chevaux avec les échantillons Jordan, Mac Phail, Bunting et Wigglesworth. Voici les caractères de ces sérums :

Sérum Jordan. — Se comporte comme un sérum A.

Sérum Mac Phail. — Très médiocre (et n'agissant guère que sur l'échantillon homologue). Par conséquent, le méningocoque Mac Phail, anormalement agglutinable, demeure à peine agglutinogène ; nous avons déjà observé semblable opposition chez diverses espèces microbiennes.

Sérum Bunting. — Se comporte comme un sérum A.

Sérum Wigglesworth. — Se comporte comme un sérum B.

Nous considérons donc les types I et III de Gordon comme des A et ses types II et IV comme des B. D'ailleurs, quand on lit attentivement les intéressants travaux du bactériologue anglais, on arrive à une conclusion quasi identique.

Nous avons, enfin, soumis à l'action de nos sérums quelques-uns des échantillons de notre ami Dopter. Voici les résultats obtenus :

Échantillon MT (méningocoque de Dopter)	Type A
Échantillons PS et PW (paraméningocoques α de Dopter)	Type B
Échantillon PL (paraméningocoque β de Dopter)	Type B
Échantillon PM (paraméningocoque β de Dopter)	Type C
Echantillon P. 25 (paraméningocoque γ de Dopter)	Type D

Il est regrettable que la majorité des méningocoques, isolés

et conservés par Dopter, ait péri lors du début des hostilités et que notre parallèle soit ainsi demeuré incomplet.

Pouvoir agglutinogène des méningocoques.

L'étude comparée des divers sérums A, B et C (sérums-réactifs ou autres) fournit des données intéressantes au double point de vue de l'*agglutination homologue* et de l'*agglutination hétérologue*.

Agglutination homologue.

[Ensemble des sérums A, sur tous les méningocoques A; ensemble des sérums B, sur tous les méningocoques B...]

D'une façon générale, les méningocoques représentent, on le sait, des germes peu agglutinogènes. Comme, d'autre part, le cheval (comparé au lapin) se montre médiocrement « agglutinopoïétique » envers eux, on comprend la faiblesse relative des sérums obtenus. C'est à cette faiblesse qu'il faut rapporter le caractère strictement univalent de ces sérums dans l'agglutination rapide et la spécificité, tantôt absolue, tantôt relative mais très nette, observée lors d'agglutination lente. La même faiblesse explique l'absence d'activité du sérum de certains chevaux et la disparition possible de cette activité. Avec des espèces bactériennes plus agglutinogènes, on ne constate rien de tel. La spécificité s'exprime ici quantitativement, les oscillations ne portent que sur le titre du sérum et ce titre ne descend jamais très bas, une fois son maximum atteint; à plus forte raison, ne s'annule-t-il en aucun cas.

Remarque. — S'il est facile de déterminer la limite supérieure d'action des sérums, leur limite inférieure échappe à toute appréciation exacte. Comme les sérums équins normaux peuvent agglutiner les méningocoques au 1/5 et (plus rarement) au 10e de cent. cube, la spécificité des sérums antiméningococciques ne saurait être affirmée (au-dessous du 20e de cent. cube (limite forcée, mais arbitraire). L'absence d'agglutination (homologue ou hétérologue) au 20e de cent. cube signifie bien résultat nul, pratiquement. Théoriquement, il est inadmissible que l'anticorps passe subitement d'une valeur définie à zéro, sous l'influence de conditions qui, ailleurs, le font simplement passer d'une valeur donnée à une valeur moindre.

En particulier, il est rare de voir des sérums qui agglutinent au delà de 1/200 de cent. cube (alors que d'autres bactéries

fournissent des sérums actifs à 1/100.000, 1/500.000, voire 1/1.000.000 de cent. cube). — Si l'on étudie la série des saignées chez les divers chevaux, on constate que le titre agglutinant s'élève plus ou moins vite; puis, tantôt il demeure indéfiniment stationnaire (oscillations peu étendues), tantôt il fléchit et peut même tomber à zéro. Quelles sont les causes qui influent sur l'intensité et l'évolution des agglutinines? Toujours les mêmes.

Le microbe choisi. En général, les types A et C apparaissent les plus agglutinogènes. Avec le type B, on obtient moins facilement de bons sérums et ces sérums sont rarement très forts. C'est aux sérums B que se rapportent surtout le fléchissement et la perte d'activité déjà mentionnés. — D'ailleurs, les divers échantillons d'un même type offrent des aptitudes agglutinogènes variables.

L'animal traité. Certains chevaux ne donnent jamais d'agglutinines, d'autres en donnent de très médiocres (notamment avec le type B).

La méthode employée. La première semble, ici, la meilleure.

La forme de l'antigène? Rien de net, jusqu'à présent.

Agglutination hétérologue.

[Ensemble des sérums, sur l'ensemble des méningocoques.]

Les sérums A peuvent agglutiner certains B et certains C; les sérums B, certains A (jamais nous ne les avons vus agglutiner des C); les sérums C, certains A et certains B. — L'évolution des agglutinines « mineures » est toujours moins régulière que celle des agglutinines « majeures », comme nous l'avons du reste observé pour tous les sérums antimicrobiens, sauf le cas du sérum Shiga-origine, vis-à-vis de l'échantillon Flexner-origine : rappelons que le sérum Shiga agglutine plus fortement le bacille de Flexner que le bacille de Shiga.

Agglutinabilité des méningocoques.

D'une façon générale, les méningocoques représentent des microbes assez peu agglutinables. En particulier, on observe de grandes variations, quant à la réaction homologue ou hétérologue, selon l'échantillon envisagé. Il n'existe aucun rapport entre l'agglutinabilité et le pouvoir agglutinogène, comme le démontre, sans aller plus loin, l'histoire du méningocoque Mac Phail.

L'étude que nous venons de faire impose donc la notion de 4 « types antigènes ». Cette notion offre une double importance *au point de vue pratique* : elle fournit un fil conducteur précieux dans les recherches épidémiologiques, notamment lors de l'examen des « porteurs de germes »; elle constitue, d'autre part, une base solide pour la préparation et l'emploi des sérums thérapeutiques. — *Au point de vue théorique*, nous avons appris l'existence d'un « antigène dominant » chez tous les méningocoques : antigène A, B, C ou D, selon le cas. Mais, étant donnée la faiblesse relative des sérums et, partant, l'impossibilité de connaître leur limite inférieure d'action (*vide supra*), on doit se demander (par comparaison avec d'autres sérums antimicrobiens beaucoup plus efficaces) si les 4 types d'antigènes n'existeraient pas réellement chez chaque méningocoque. La réaction de Bordet-Gengou va répondre affirmativement à cette question.

ÉTUDE DE LA RÉACTION DE BORDET-GENGOU

Nous en avons fait un procédé quantitatif et superposable, dans la mesure du possible, à la réaction agglutinante; ce qui permettra d'utiles comparaisons.

Les premières recherches ont été entreprises avec les sérums-réactifs; les recherches ultérieures, avec l'ensemble de tous les sérums.

Nous étudierons, successivement : la *préparation des suspensions microbiennes*; la *technique de la réaction*; les *résultats de nos expériences*.

PRÉPARATION DES ÉMULSIONS MICROBIENNES

Comme pour l'agglutination, mais on plonge l'émulsion pendant 5 minutes dans l'eau bouillante avant de s'en servir. Nous avons pu nous convaincre que la réaction de Bordet-Gengou donne ainsi des résultats beaucoup plus réguliers, *avec toute espèce de germes.*

TECHNIQUE DE LA RÉACTION

Supposons, d'abord, le cas où l'on veut titrer un sérum en le faisant agir sur l'échantillon correspondant. On verse 1 cent. cube d'émulsion dans 8 tubes. Dans le premier, aucune addition ultérieure; dans les deux suivants, addition de sérum équin normal; dans le reste, addition de sérum spécifique. Le tout, d'après le schéma suivant :

1. Émulsion seule.	
2. Émulsion + sérum équin normal . .	1/100 de cent. cube. 1/200 de cent. cube.
3. Émulsion + sérum spécifique.	1/100 de cent. cube. 1/200 de cent. cube. 1/500 de cent. cube. 1/1.000 de cent. cube. 1/2.000 de cent. cube.

(Il est plus rare que l'on soit amené à ajouter 1/5.000 de cent. cube du sérum spécifique.)

On verse, ensuite, 1/20 de cent. cube de sérum frais de cobaye (complément) dans chaque tube; on mêle et on laisse à l'étuve pendant une heure. Puis, on ajoute, toujours dans chaque tube, 1/20 de cent. cube de sérum hémolytique anti-mouton (plus ou moins dilué) et 1/20 de cent. cube de globules de mouton (lavés et ramenés au volume initial du sang). On mêle intimement et on replace à l'étuve. On surveille l'hémolyse et, quand elle est complète pour les « tubes-sérum normal », on examine les « tubes-sérum spécifique ». Le titre de ce sérum spécifique se trouve indiqué par le rang du dernier tube non hémolysé.

Remarques. L'émulsion seule constitue un témoin intéressant, mais pratiquement superflu.

La quantité de complément conseillée se montrera parfois excessive; cela dépend des animaux et de la saison (le complément est plus fort en hiver qu'en été).

La dilution de sérum hémolytique variera suivant la « force » de celui-ci, révélée par un titrage préalable.

Dans le cas où l'on désire étudier un sérum, en le faisant agir sur plusieurs échantillons du même type ou de types différents, on constitue autant de séries de 8 tubes qu'il existe d'échantillons.

Dans le cas où l'on désire étudier plusieurs sérums, en les faisant agir sur un seul échantillon, les groupes 1 et 2 demeurent conformes au schéma, mais on constitue autant de groupes 3 qu'il existe de sérums.

RÉSULTATS DE NOS EXPÉRIENCES

Nous considérons la réaction de Bordet-Gengou, telle que nous la mettons en œuvre, comme une excellente mesure du « pouvoir lytique » (bactériolytique) des sérums. Aussi l'avons-nous utilisée, au point de vue pratique, pour le *titrage des sérums thérapeutiques* — et, au point de vue théorique, pour l'étude des *types méningococciques*, de la « *faculté lysogène* » des *méningocoques* et de la *sensibilité de ces germes, vis-à-vis des lysines* (bactériolysines) *spécifiques*.

TITRAGE DES SÉRUMS THÉRAPEUTIQUES.

Ne possédant, actuellement, aucun moyen sûr de titrage *in vivo*, la méthode de Bordet-Gengou (quantitative) nous est apparue comme susceptible de résoudre le problème *in vitro* : espoir pleinement justifié.

Grâce à la collaboration assidue de notre ami Netter, dont on connaît la compétence en matière de méningite cérébro-spinale, nous avons pu établir la relation suivante : *tout sérum, qui fixe le complément, sous le volume de* 1/2.000 (voire 1/1.000) *de cent. cube, en présence de l'antigène homologue* (ou d'antigènes du même type), *jouit*, dans la règle, *d'un excellent pouvoir curatif, au regard des méningites occasionnées par le type correspondant de méningocoques*. L'analyse d'observations nombreuses et détaillées ne laisse aucun doute là-dessus. Est-ce à dire que les sérums thérapeutiques aient atteint une perfection absolue? Nullement. Et voici ce qu'il faut faire, croyons-nous, pour les rendre encore plus efficaces.

On recherchera, avec soin, des échantillons, soit rapidement envahissants, soit particulièrement tenaces et on immunisera des chevaux avec ces échantillons. Les sérums, ainsi obtenus, auront des chances de réussir dans les infections déterminées par des germes semblables et, *a fortiori*, par des germes « ordinaires ». Telle est la voie où nous sommes actuellement engagés.

Les méningocoques A et B étant, présentement, les agents presque exclusifs des méningites cérébro-spinales, nous avons préparé, sur la demande du professeur Netter, des sérums « A+B », par immunisation des chevaux avec un mélange (ââ) des deux types. Lorsque ces sérums fixent le complément, sous le volume de 1/2.000 (voire 1/1.000) de cent. cube, en présence des types A *et* B, ils sont susceptibles de guérir les « méningites A » *et* les « méningites B », comme l'a prouvé Netter.

Il est donc indiqué, pratiquement, de soigner tous les cas de méningite avec le sérum « A+B ». Les médecins, qui se trouvent au voisinage des laboratoires et connaissent ainsi, chaque fois, le type de méningocoque auquel ils ont affaire, pourront, après la première injection, *obligée*, de sérum « A+B », continuer le traitement avec un sérum monovalent (il le faudra, absolument, s'il s'agit d'un type C).

Nous venons de voir en quoi la réaction de Bordet-Gengou fournit des résultats clairs et précieux. Nous allons voir en quoi elle fournit de nouveaux résultats, aussi précieux, mais moins clairs de prime abord.

Les types méningococciques et la réaction de Bordet-Gengou.

[Nous laisserons dorénavant de côté ce qui concerne le type D.]

Voici ce que montre l'étude des sérums A, B et C (sérums-réactifs ou autres), quand on les fait agir, parallèlement, sur de nombreux méningocoques, étiquetés A, B et C d'après l'agglutination. La spécificité des sérums, uniquement quantitative ici, n'est pas constante; elle existe cependant le plus habituellement, bien que les valeurs, obtenues avec des germes hétérologues, se rapprochent volontiers de la valeur obtenue avec le germe homologue. Ces résultats d'ensemble ne sauraient détruire les données fournies par l'agglutination, mais ils demandent à être analysés de près et expliqués nettement. Entrons d'abord dans le détail des faits.

« POUVOIR LYSOGÈNE » DES MÉNINGOCOQUES.

Réaction homologue.

D'une façon générale, les méningocoques représentent des germes bien lysogènes, alors qu'ils demeurent, avons-nous vu, peu agglutinogènes. Comme, d'autre part, le cheval se montre bien « lysopoïétique » envers eux, on comprendra le caractère multivalent des sérums, leur activité constante et l'impossibilité de voir cette activité tomber à zéro — affaire d'*échelle*, plus grande ici que pour le phénomène de l'agglutination.

En particulier, on obtient aisément des sérums qui « fixent » à 1/2.000 de cent. cube (et même parfois à 1/5.000); avec les plus lysogènes, parmi les autres bactéries, on dépasse rarement la valeur 1/5.000. — D'autre part, le pouvoir lytique atteint d'ordinaire rapidement son maximum, contrairement au pouvoir agglutinant. Il demeure ensuite stationnaire (oscillations habituellement peu étendues) et ne fléchit que chez quelques sujets. Quelles sont les causes qui influent sur le pouvoir lysogène? Encore les mêmes que précédemment.

Le microbe choisi. D'une façon générale, les 3 types se montrent également lysogènes; en particulier, il faut tenir compte de l'échantillon utilisé.

L'animal traité. Certains chevaux donnent des sérums faibles; le titre de ces sérums atteint cependant, éventuellement, 1/500 de cent. cube.

La méthode employée. Avec la troisième méthode, on peut obtenir, *en 15 jours*, des sérums curatifs.

La forme de l'antigène? Rien de net, jusqu'ici.

Réaction hétérologue.

Dans la règle, disions-nous, les sérums demeurent spécifiques, mais la chose n'est pas constante. Voyons, de plus près.

Soit un sérum A (par exemple), examiné en présence de 3 méningocoques : A, B et C. La fixation, en présence du méningocoque A, sera toujours obtenue avec le volume minimum de sérum ; en présence des méningocoques B et C, parfois aussi. — Parcourons, maintenant, les résultats observés lors des saignées suivantes, avec ce même sérum A. La fixation, en présence du méningocoque A, continuera à être

obtenue avec le volume minimum de sérum; les fixations anormales se montreront inconstantes et ne se correspondront pas d'une saignée à l'autre.

Donc : réaction homologue régulière, réactions hétérologues capricieuses.

Sensibilité des méningocoques aux lysines spécifiques.

La réaction de Bordet-Gengou et, mieux encore, l'effet thérapeutique des sérums, démontrent la grande sensibilité des méningocoques aux lysines spécifiques.

De nombreuses recherches, entreprises sur diverses bactéries, nous ont amenés (nos collaborateurs et nous) à considérer tout microbe non seulement comme une « mosaïque de propriétés biologiques », mais encore comme une « mosaïque d'antigènes ». L'association de ces antigènes caractérise l'*espèce*, la dominance habituelle de l'un d'entre eux, le *type* (antigène). L'étude que nous venons de faire s'accorde pleinement avec cette conception. En effet, par leur force, les lysines spécifiques nous ont toujours révélé, dans chaque méningocoque, la coexistence des divers antigènes méningococciques; par leur faiblesse relative, les agglutinines nous ont toujours fait voir, dans chaque méningocoque, l'antigène dominant (et inconstamment, entrevoir les autres). Si l'action des lysines masque parfois la *caractéristique du type* au profit de la *caractéristique de l'espèce*, cette caractéristique du type reparaît immédiatement, quand on analyse les faits. Alors que le pouvoir lytique demeure constamment maximum pour tous les échantillons d'un groupe considéré, il ne s'élève, pour certains échantillons « étrangers », que d'une façon accidentelle et irrégulière. Sous des influences obscures, les chevaux peuvent réagir, exagérément, aujourd'hui à tel antigène non dominant, demain à tel autre; c'est ce que nous avons observé avec des bactéries très variées et nous ne nous en étonnons plus depuis longtemps.

On saisit donc bien que la réaction de Bordet-Gengou ne s'oppose nullement aux phénomènes d'agglutination et que les types méningococciques conservent leur légitimité et leur importance pratique.

EXPÉRIENCES

SUR L'ACTION BACTÉRICIDE DE LA LUMIÈRE SOLAIRE

(LUMIÈRE BLANCHE TOTALE

ET LUMIÈRES PARTIELLES OU DE COULEURS)

par le Médecin principal MIRAMOND DE LAROQUETTE.

L'action des rayons solaires sur les bactéries, étudiée par de nombreux auteurs, a été surtout retenue comme une action destructive dite bactéricide, dans laquelle les rayons chimiques, et particulièrement les ultra-violets, auraient un rôle presque exclusif.

Cette donnée générale mérite d'être examinée de près, en raison des applications auxquelles elle conduit en hygiène et en thérapeutique. C'est elle en effet qui, depuis Finsen, a servi de base première aux méthodes photothérapiques et de cure solaire. Des faits nombreux pourtant, des observations biologiques, cliniques ou de la vie courante, particulièrement dans les pays chauds où les bactéries ne manquent pas, malgré tant de lumière à profusion répandue, paraissent montrer que l'action bactéricide de la lumière solaire n'est pas aussi efficace, aussi constante qu'on le croit généralement, et qu'elle demande pour s'exercer des conditions spéciales à préciser.

Les expériences que nous allons rapporter, et qui font suite à d'autres expériences personnelles (1909-1912) de même ordre, mais moins précises, ont été faites dans le but de vérifier ou d'ajouter dans ces questions quelques points importants : Dans quelle mesure la lumière solaire est-elle bactéricide dans l'air, dans les milieux liquides et solides ? Jusqu'à quelle profondeur agit-elle dans ces milieux? Quelles intensités et quelles durées d'insolation cette action exige-t-elle ? De quelle manière s'exerce-t-elle ? Action chimique, action calorifique, dessiccation ? Quelles différences présentent, à ce point de vue, les diverses radiations du spectre solaire ?

Ces expériences ont été faites à Alger, en deux séries principales : la première en mai, juin, juillet 1914, la seconde en novembre, décembre 1916, avec la cordiale assistance, dans la première série, du médecin principal Roussel, dans la seconde, du Dr Alliot, tous deux successivement chefs du Laboratoire de bactériologie de l'Hôpital militaire d'Alger.

M. Roussel et M. Alliot ont bien voulu, pour chaque expérience, fournir les cultures et les milieux, présider aux ense-

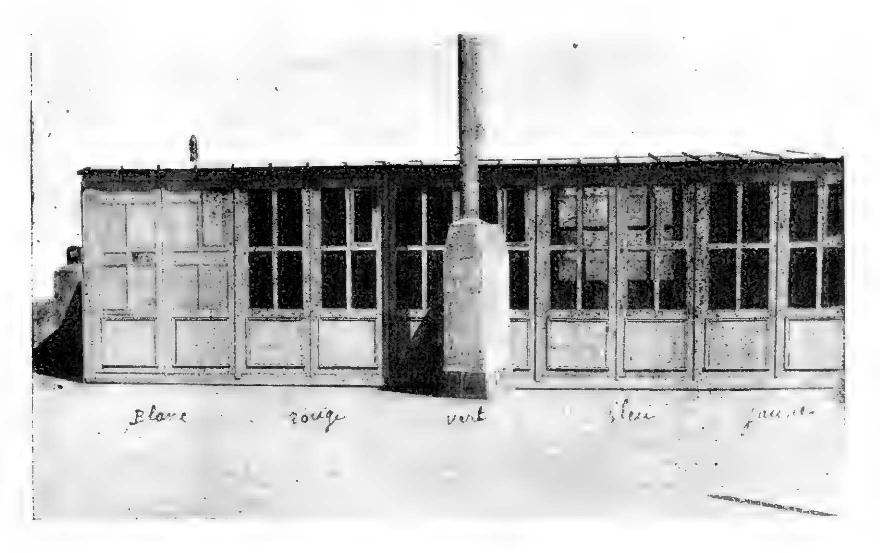


Fig. 1. — Laboratoire en serres vitrées blanche et de couleurs (Algérie).

mencements et aux repiquages, contrôler les résultats. Nous leur renouvelons, ici, nos bien sincères remerciements.

Les circonstances ne nous ont pas permis de poursuivre ces expériences aussi loin que nous le désirions ; telles quelles, cependant, elles permettent d'utiles déductions.

Pour certaines d'entre elles, nous avons utilisé des serres blanches et de couleurs (bleue, verte, jaune, rouge), que nous avons fait construire à Alger pour l'étude des actions biologiques de la lumière solaire et où, de 1911 à 1914, ont été en permanence cultivées des plantes, des bactéries, des moisissures, et diverses espèces animales :

Ces serres (fig. 1 et 2), symétriquement disposées sur la ter-

rasse d'une maison en plein soleil, sont orientées nord-sud, de manière que chacune d'elles reçoive une égale quantité de lumière. Un côté de chaque serre est, pendant le jour, constamment au soleil; le côté opposé permet l'observation permanente à l'ombre, mais dans une lumière diffuse intense.

Dans la serre blanche, un compartiment fermé, formant caisse, a été réservé comme chambre noire où des cultures sont placées pour servir de témoins.

La première série des expériences ici rapportées, faite en été, a permis d'agir sur les bactéries, avec une intensité maximum de rayonnement. La deuxième série, faite en automne, a permis d'agir avec des intensités modérées proches de celles observées en été dans le Nord de la France. Voici des *températures* relevées dans les serres, pendant les deux saisons :

	SERRES					CHAMBRE
	BLANCHE	BLEUE	VERTE	JAUNE	ROUGE	NOIRE
Juillet 1914 :	Degrés	Degrés	Degrés	Degrés	Degrés	Degrés
Moyenne à l'ombre.	33	30	27	31	30	25
Moyenne au soleil .	44	37	34	38	37	»
Maximum observé .	55	46	42	46	46	35
Minimum	19	17	16	17	17	18
Décembre 1914 :						
Moyenne à l'ombre.	22	16	15	17	17	15
Moyenne au soleil .	35	27	25	29	28	»
Maximum.	43	38	35	39	37	26
Minimum	14	12	10	12	13	13
Coefficient d'action chimique	100	90	2	3	0,1	0
Coefficient d'évaporation	100	65	54	84	66	15

Les coefficients d'évaporation ont été établis en mesurant la quantité d'eau évaporée dans chaque serre, en des temps donnés, dans des cristallisoirs tous symétriquement disposés au soleil, et les coefficients d'action chimique, en mesurant le temps d'insolation nécessaire pour obtenir une même teinte au papier photographique, sous les différents verres.

Les clichés de la fig. 3 donnent l'analyse spectrographique de ces verres — les verres de couleur ne sont pas absolument

monochromatiques, mais ils filtrent des parties bien distinctes du spectre, et notamment délimitent les parties dites chimiques et calorifiques. Pour éliminer l'ultra-violet, nous avons, dans certaines expériences, employé des lames de verre épaisses

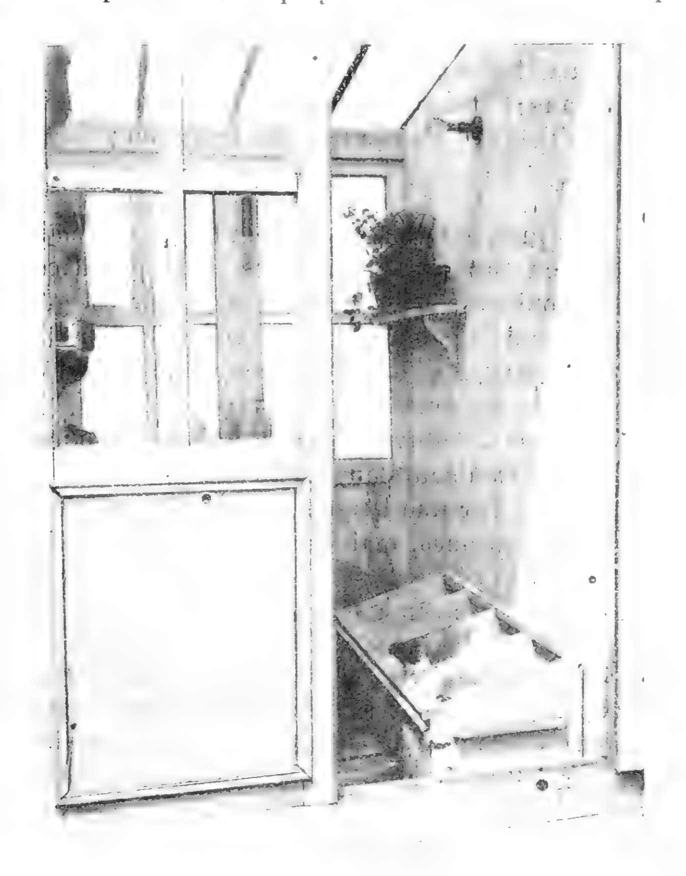


FIG. 2. — Serre blanche ouverte.

de 1 centimètre et pour l'infra-rouge des récipients (cristallisoirs, boîtes de Petri) remplis d'eau.

*
* *

Voici, résumées, les diverses expériences. Certaines ont été répétées trois ou quatre fois. Nous ne retenons ici qu'un exemple de chaque.

Bactéries dans l'air.

I. — Sur une terrasse de l'hôpital militaire Maillot, à Alger, le 20 juin 1914, à 16 heures, à la fin d'une journée très claire, très chaude et sans vent (température moyenne, au soleil, 40 à 46°), on fait passer par aspiration (siphon) 5 litres d'air par flacon dans 2 flacons de bouillon stérilisé que l'on met aussitôt après l'étuve : l'un se trouble, le 2e jour; l'autre reste stérile.

II. — Le 24 juin, à 11 heures, par un temps très clair et très chaud (42°), on fait passer 12 litres d'air par flacon dans 4 flacons de bouillon stérilisé. Pour 1 et 2, l'air est prélevé en plein soleil devant la galerie de cure solaire de l'hôpital; pour 3 et 4, l'air est prélevé à l'ombre, dans un coin du jardin voisin de la galerie, pas de vent.

Les flacons mis à l'étuve : 1 se trouble le 3e jour, 2 reste stérile, 3 et 4 se troublent dans les 24 heures.

Conclusion. — Par une longue et forte insolation, l'air est très appauvri en germes, mais non absolument stérilisé.

Bactérium coli dans l'eau.

III. — Six boîtes de Petri, contenant chacune 75 cent. cubes d'eau, sous 10 millimètres d'épaisseur, sont ensemencées chacune avec XV gouttes de culture de *B. coli* en bouillon, puis exposées au soleil le 17 juin, de 10 à 15 heures, soit pendant 5 heures.

1 et 2, découvertes à l'air libre;
3 et 4, découvertes et entourées de glace, dans un cristallisoir;
5 et 6, entourées de glace, dans un cristallisoir et couvertes avec une plaque de verre épaisse de 1 centimètre.

Temps très clair. Température à 11 heures : 42° au thermomètre brillant, 49° au thermomètre noir; pas de vent. A 17 heures, avec l'eau restant dans les boîtes, on ensemence 12 tubes de bouillon phéniqué (2 par boîte); le lendemain, tous les tubes ont poussé (*B. coli* vérifié).

Conclusion. — Le *B. coli* dans l'eau, sous 10 millimètres d'épaisseur, a résisté à 5 heures de très forte insolation.

IV. — Quatre boîtes de Petri, contenant chacune 20 cent. cubes d'eau, sous 2mm5 d'épaisseur, ensemencées chacune avec XV gouttes de culture de *B. coli*, sont exposées au soleil le 27 juin, de 9 heures à 17 heures, soit pendant 8 heures.

1 et 2, découvertes;
3 et 4, fermées.

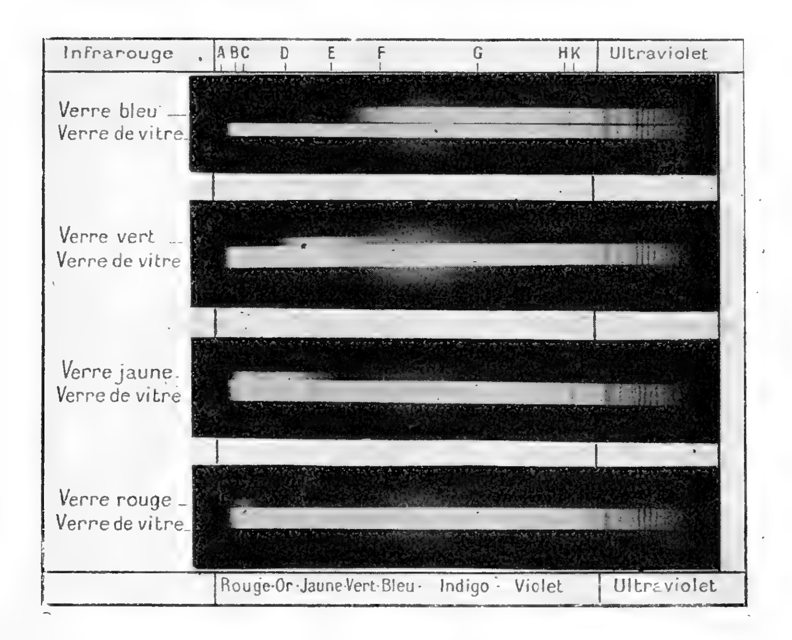


Fig. 3. — Spectrogrammes des verres des serres blanche et de couleurs. Lumière solaire, 10 juin 1914.

(Clichés sur plaques Wratten panchromatiques.)

Temps clair. Température à 9 heures : 34° au thermomètre brillant, 39° au thermomètre noir. A 17 heures, repiquage sur tube de bouillon phéniqué : 2 par boîte. Rien ne pousse.

Conclusion. — Le *B. coli* dans l'eau, sous 2mm5 d'épaisseur, a été tué même en boîte fermée, à travers le verre, par 8 heures d'insolation.

V. — Six boîtes de Petri, contenant chacune 20 cent. cubes d'eau sous 2mm5 d'épaisseur, ensemencées de *coli*, sont exposées

découvertes au soleil, le 3 juillet; temps clair, température : 40°.

1 et 2, de 9 à 11 heures, soit : 2 heures d'insolation;
3 et 4, de 9 à 13 heures, — : 4 — d'insolation;
5 et 6, de 9 à 15 heures, — : 6 — d'insolation.

A 16 heures, 6 tubes de bouillon phéniqué sont ensemencés avec l'eau restant dans les boîtes, 1 tube par boîte : 1, 2 et 3 poussent dans les 24 heures; 4, 5 et 6 restent stériles.

Conclusion. — Le *B. coli* dans l'eau, sous $2^{mm}5$ d'épaisseur, a été tué en 3 ou 4 heures de forte insolation.

VI. — Six boîtes de Petri, contenant (1, 2 et 3) 20 cent. cubes d'eau (4, 5 et 6) 40 cent. cubes, sont ensemencées avec XV gouttes de culture de *B. coli* et exposées au soleil, le 4 juillet. Température : 38-40°, au thermomètre brillant.

1	20 c.c.	d'eau exposée	4 h.	Découverte.	Repiquage sur bouillon phéniqué.	Négatif.
2	20 c.c.		4 h.	Découverte.		Négatif.
3	20 c.c.		4 h.	Sous un verre de 1 cent. d'épaisseur.		Négatif.
4	40 c.c.		7 h.	Découverte.		Positif.
5	40 c.c.		7 h.	Découverte.		Positif.
6	40 c.c.		7 h.	Sous un verre de 1 cent. d'épaisseur.		Positif.

Conclusion. — Le *B. coli*, tué en 4 heures dans 20 cent. cubes d'eau, épaisseur $2^{mm}5$, a résisté à 7 heures dans 40 cent. cubes, épaisseur 5 millimètres. La filtration des rayons par le verre épais, qui absorbe l'ultra-violet, n'a pas modifié les effets obtenus.

VII. — Quatre boîtes de Petri, contenant 20 cent. cubes d'eau ensemencées de *B. coli*, sont exposées au soleil, le 4 juillet (température 40°), sous leur couvercle retourné et plein d'eau.

1 et 2,	pendant 4 h., de 9 à 13 h.	Repiquage sur bouillon phéniqué.	Positif, pour 1 et 2
3 et 4,	— 7 h., de 9 à 16 h.		Négatif, pour 3 et 4

Conclusion. — La filtration des rayons par une couche d'eau de 1 centimètre, qui absorbe une partie de l'infra-rouge et de l'ultra-violet, n'a pas modifié les résultats précédemment obtenus avec le rayonnement total.

VIII. — Dix boîtes de Petri, contenant chacune 20 cent. cubes d'eau, sous $2^{mm}5$ d'épaisseur, ensemencée avec XV gouttes de

culture de *B. coli*, sont exposées au soleil le 10 juillet, dans les conditions suivantes :

1	Découvertes à l'air libre.	de 9 à 12 h., soit : 3 h.	d'insolation, après laquelle il reste dans les boîtes :	4 c.c. d'eau	Repiquage sur bouillon phéniqué.	Négatif.
2		de 9 à 13 h., soit : 4 h.		1 c.c. d'eau		Négatif
3		de 9 à 14 h., soit : 5 h.		0 c.c. 5 d'eau		Négatif.
4	Découvertes mais entourées de glace, dans un cristallisoir,	de 9 à 12 h., soit : 3 h.		14 c.c. d'eau		Positif.
5		de 9 à 13 h., soit : 4 h.		12 c.c. d'eau		Positif.
6		de 9 à 14 h., soit : 5 h.		10 c.c. d'eau		Positif.

Conclusion. — Le refroidissement continu de la boîte par la glace a diminué l'évaporation et empêché la stérilisation de l'eau; la chaleur a donc une part importante dans *l'affection bactéricide* de la lumière solaire; elle paraît, en partie, agir par l'évaporation.

IX. — Dix boîtes de Petri, contenant 20 cent. cubes d'eau, ensemencées de *B. coli*, sont, le 3 juillet, exposées au soleil, de 9 heures à 16 heures (soit pendant 7 heures), température : 40 à 45°.

1 et 2	Découvertes (un intervalle de 1 centimètre séparant le verre de la boîte), sous un verre	rouge.	A la fin de l'expérience l'eau est réduite dans les boîtes à	10 c.c.	Repiquage sur bouillon phéniqué.	Pos.
3 et 4		jaune.		10 c.c.		Pos.
5 et 6		vert.		12 c.c.		Pos.
7 et 8		bleu.		10 c.c.		Pos.
9 et 10		de vitre.		2 c.c.		Nég.

Conclusion. — La filtration de la lumière par des verres de couleur, quels qu'ils soient, réduit de beaucoup son pouvoir d'évaporation et parallèlement son action bactéricide.

Bacterium coli dans le bouillon.

X. — Quatre tubes de bouillon ensemencés de *B. coli* sont exposés au soleil : 1 et 2 pendant 6 heures, 3 et 4 pendant 8 heures, le 2 juillet; température : 38 à 40°. Repiquage le soir, sur bouillon phéniqué, négatif pour 3 et 4, positif pour 1 et 2.

Conclusion. — Le *B. coli* en bouillon, dans un tube à essai de 15 millimètres, a résisté à 6 heures de forte insolation, mais a été tué en 8 heures.

XI. — Six boîtes de Petri, contenant 20 cent. cubes de bouillon ensemencé de *B. coli*, sont exposées ouvertes au soleil, le 3 juillet; température : 42°.

1 et 2 exposées de 9 à 11 h., soit pendant 2 heures	Repi-quage.	1 et 2 pos.
3 et 4 — de 9 à 13 h., soit — 4 heures		3 nég., 4 pos.
5 et 6 — de 9 à 15 h., soit — 6 heures		5 et 6 nég.

Conclusion. — Le *B. coli* en bouillon, étalé en lame mince de 2mm5, est détruit comme dans l'eau par 4 à 5 heures d'insolation.

XII. — Dix boîtes de Petri, contenant 20 cent. cubes de bouillon ensemencé de *B. coli*, sont exposées ouvertes, le 4 juillet, de 9 heures à 16 heures, soit pendant 7 heures; température : 42°.

1 et 2	Sous un verre	de vitre.	Les verres sont maintenus à 1 cent. de la boîte pour permettre l'évaporation.	Repi-quage.	1 et 2 négatifs.
3 et 4		bleu.			3 et 4 positifs.
5 et 6		vert.			5 et 6 positifs.
7 et 8		jaune.			7 et 8 positifs.
9 et 10		rouge.			9 et 10 positifs.

Conclusion. — Résultats identiques à ceux de l'expérience IX sur le *B. coli* dans l'eau. Les lumières filtrées ont un pouvoir réduit, aussi bien le bleu que le rouge.

XIII. — Douze tubes de bouillon ensemencés de *B. coli* sont placés, le 13 mai, dans les serres blanche et de couleurs (2 dans chaque serre) et 2 en chambre noire, à l'ombre, mais sous une intense lumière diffuse.

Ils servent le 25 juin, soit 43 jours après, à repiquer des tubes de bouillon phéniqué qui sont mis à l'étuve; tous poussent dans les 24 heures.

Conclusion. — En tubes de bouillon, le *B. coli* a vécu à la lumière diffuse blanche et de couleur pendant 43 jours.

BACTERIUM COLI SUR POMME DE TERRE.

XIV. — Deux tubes de *culture* fraîche de *B. coli* sur pomme de terre sont exposés au soleil, le 26 juin, de 9 heures à 16 heures, soit pendant 7 heures; température : 38 à 40°. Repiquage le soir sur bouillon phéniqué, positif sur les 2 tubes dans les 24 heures.

Conclusion. — Le *B. coli* sur pomme de terre a résisté à 7 heures de forte insolation.

Bacterium coli sur gélose.

XV. — Six boites de culture fraîche de *B. coli*, sur gélose verte (milieu de Fowam), sont exposées découvertes au soleil, le 4 juillet; température : 40°.

1 pendant 30 minutes.	Repiquage sur bouillon phéniqué.	Positif.
2 — 1 heure. .	Repiquage sur bouillon phéniqué.	Positif.
3 — 1 h. 30 . .	Repiquage sur bouillon phéniqué.	Positif.
4 — 2 heures .	Repiquage sur bouillon phéniqué.	Négatif.
5 — 2 h. 30 . .	Repiquage sur bouillon phéniqué.	Négatif.
6 — 3 heures .	Repiquage sur bouillon phéniqué.	Négatif.

Sur 4, 5 et 6, dessiccation très accusée de la culture et du milieu; la gélose est coagulée, le prélèvement avec l'öse de platine est presque impossible, l'ensemencement en bouillon est fait avec un fragment de gélose.

Conclusion. — Sur gélose, le *B. coli* a été tué en 2 heures.

XVI. — Six boites de culture fraîche de *B. coli* sur gélose verte sont exposées au soleil, le 13 juillet, de 9 heures à 16 heures, soit pendant 7 heures; température : 40°.

1 à l'air libre. Découvert. .	Un intervalle de 2 cent. est maintenu entre le verre et les boites pour l'évaporation.	Repiquage sur bouillon phéniqué.	1 négatif.
2 sous verre de vitre			2 négatif.
3 — bleu.			3 négatif.
4 — vert.			4 négatif.
5 — jaune			5 négatif.
6 — rouge			6 négatif.

Conclusion. — Sur gélose, le *B. coli* a été tué sous les verres de couleur comme à l'air libre, par 7 heures d'insolation.

XVII. — Sept boites de Petri, contenant des cultures fraîches de *B. coli* sur gélose verte, sont exposées au soleil; température : 38-40°, de 12 heures à 16 heures.

1 Découverte à l'air libre	Repiquage.	1 négatif.	Dessiccation très accusée du milieu et des cultures.
2 Sous un verre de vitre, épais de 8 millimètres	—	2 négatif.	
3 Sous son couvercle retourné et plein d'eau.	—	3 négatif.	
4 Sous un verre bleu de 5 millimètres d'épaisseur.	Repiquage.	4 positif.	Dessiccation legère, prélèvement facile.
5 Sous un verre bleu de 5 millimètres d'épaisseur.	—	5 positif.	
6 Sous un verre jaune de 5 millimètres d'épaisseur.	—	6 positif.	
7 Sous un verre rouge de 5 millimètres d'épaisseur	—	7 positif.	

Un intervalle de 2 centimètres est maintenu pour l'évaporation entre les verres et les boîtes.

Conclusion. — Sur gélose, le *B. coli* a été tué en 4 heures sous le verre épais et sous le couvercle plein d'eau, retenant la plus grande partie de l'infra-rouge et de l'ultra-violet. Il a résisté sous tous les verres de couleur, même le bleu.

XVIII. — Quatre boîtes de cultures fraîches de *B. coli* sur gélose verte sont exposées au soleil pendant 4 heures, de 9 heures à 13 heures, le 10 juillet; température : 40°.

1 Découverte à l'air libre.	Repiquage sur bouillon.	Négatif.
2 Découverte, mais la culture protégée par une mince lame de peau de porc (1 millim. d'épaisseur).		Positif.
3 Découverte, culture protégée par une mince lame de lard (1 millimètre)		Positif.
4 Découverte, culture protégée par une mince lame de muscle		Positif.

Dans la boîte 2, la lamelle de peau s'est desséchée au soleil et recroquevillée laissant, à la fin de l'expérience, la culture à nu; dans 3 et 4, les lamelles, un peu réduites, étaient restées adhérentes.

Conclusion. — De minces couches (1 millimètre) de peau, de graisse ou de muscle protégeant les cultures ont empêché la destruction du *B. coli*.

XIX. — Quatre boîtes de *B. coli* sur gélose verte sont exposées au soleil de 9 heures à 13 heures, le 15 juillet.

1 Boîte découverte, à l'air libre. Culture à nu . . .	Repiquage sur bouillon.	Négatif.
2 Boîte découverte, mais culture couverte par une mince lame de lard de 1 millimètre d'épaisseur.		Positif.
3 Boîte découverte, entourée de glace dans un cristallisoir. Culture à nu.		Positif.
4 Boîte découverte, entourée de glace dans un cristallisoir. Culture couverte par une lame de lard		Positif.

Conclusion. — La glace entourant les boîtes a empêché la dessiccation de la gélose et des cultures, qui ont résisté, même à nu, à 4 heures de forte insolation.

BACILLE D'EBERTH SUR GÉLOSE.

XX. — Six boîtes de culture fraîche de bacille d'Eberth sur gélose verte sont exposées, découvertes au soleil, le 8 juillet 1914, à 9 heures; température : 36-38°.

1	pendant 30 minutes.	Repiquage sur bouillon.	Positif.	Dessiccation légère de la culture, prélèvement facile, pour l'ensemencement en bouillon.
2	— 1 heure.		Positif.	
3	— 1 h. 30		Positif.	
4	— 2 heures		Négatif.	Dessiccation très accusée. Gélose craquelée. Prélèvement impossible, ensemencement avec un fragment de gélose.
5	— 2 h. 30		Négatif.	
6	— 30 minutes.		Négatif.	

Conclusion. — Le bacille d'Eberth comme le *B. coli* est tué sur gélose en 2 heures d'insolation.

XXI. — Six boîtes de culture de bacille d'Eberth sur gélose verte sont exposées au soleil, découvertes, le 9 juillet 1914, à 9 heures; température : 40°.

1	Culture à nu	Pendant 1 heure.	Repiquage.	Positif.
2	Culture couverte par une mince couche de vaseline, 1/2 millimètre environ	Pendant 1 heure.	Repiquage.	Positif.
3	Culture à nu	— 2 heures.	—	Négatif.
4	Culture couverte de vaseline	— 2 —	—	Positif.
5	Culture à nu	— 3 —	—	Négatif.
6	Culture couverte de vaseline	— 3 —	—	Négatif.

Conclusion. — La vaseline en couche très mince a retardé d'une heure environ la destruction du bacille d'Eberth.

STREPTOCOQUE SUR POMME DE TERRE ET EN BOUILLON.

XXII. — Quatre tubes de culture fraîche de Streptocoque, 2 sur pomme de terre, 2 en bouillon, sont exposés au soleil, le 26 juin 1914, de 9 heures à 16 heures, soit pendant 7 heures; température : 38°. Repiquage sur bouillon positif pour les 4 tubes.

Conclusion. — Le Streptocoque en tubes, sur pomme de terre et en bouillon, a résisté à 7 heures d'insolation.

STAPHYLOCOQUE SUR POMME DE TERRE, EN BOUILLON ET SUR GÉLOSE.

XXIII. — Quatre tubes de culture fraîche de Staphylocoque, 2 sur pomme de terre et 2 sur bouillon, sont exposés au soleil

le 26 juin 1914, de 9 heures à 16 heures. Repiquage sur bouillon positif pour tous les tubes.

Conclusion. — Le Staphylocoque, en tubes sur pomme de terre ou bouillon, a résisté à 7 heures d'insolation.

XXIV. — Une culture fraîche de *Staphylocoque* (citreus) en bouillon sert à ensemencer, le 30 novembre 1916, 12 *boîtes de gélose* qui sont placées 2 par 2 bien au soleil dans les *serres blanche et de couleur*, et 2 autres en chambre noire. Elles y restent jusqu'au 6 janvier et y sont journellement observées; elles y reçoivent en moyenne, malgré la saison, 6 à 7 heures de soleil par jour, ce qui, pour les 38 jours, représente environ 250 heures d'insolation et 130 heures de lumière diffuse.

Elles sont repiquées le 38e jour sur bouillon.

Le tableau ci-dessous résume le résultat des observations et du repiquage.

	CULTURES	DÉBUT	ASPECT le 8e jour	ASPECT le 15e jour	ASPECT le 30e jour	REPIQUAGE le 38e jour
S. blanche.	1	3e j.	Assez belle, blanche.	Médiocre, blanche.	Desséchée, grise.	Négatif.
S. bleue.	2	2e j.	Belles, jaune clair.	Assez belles, jaunes.	Médiocres, minces, jaunes.	2 négatifs.
S. verte.	2	2e j.	Belles, jaunes.	Belles, jaunes.	Médiocres, minces, jaunes.	2 négatifs.
S. jaune.	2	2e j.	Belles, jaunes.	Belles, jaunes.	Médiocres, minces, jaunes.	2 négatifs.
S. rouge.	2	2e j.	Belles, jaunes.	Belles, jaunes.	Médiocres, minces, jaunes.	1 nég., 1 pos.
Ch. noire.	2	2e j.	Très belles, jaunes.	Très belles, jaunes.	Assez belles, jaunes.	2 positifs.

En résumé : Cultures bien venues partout, sauf en lumière blanche où elles n'ont pas pris leur couleur jaune normal et où la dessiccation a été très forte, plus belles dans le noir. Mortes partout en 38 jours, sauf dans le noir (2 sur 2) et sur le rouge (1 sur 2).

XXV. — Avec la même culture de *Staphylocoque*, le 30 novembre, 12 *tests de papier* sont ensemencés et placés 2 par 2 dans des boîtes de Petri, qui sont mises au soleil dans les serres. Ces tests sont repiqués dans des tubes de bouillon à

l'étuve, un le 22 novembre (22e jour), l'autre le 6 janvier (38e jour).

Résultats :	SERRE blanche	SERRE bleue	SERRE verte	SERRE jaune	SERRE rouge	CHAMBRE noire
	—	—	—	—	—	—
Repiquage du 22e j.	Négatif.	Positif.	Positif.	Positif.	Positif.	Positif.
— 38e j.	Négatif.	Négatif.	Positif.	Négatif.	Négatif.	Positif.

Conclusion. — Sur tests de papier, le Staphylocoque a résisté partout sauf dans le blanc à 22 jours ; il a été tué partout en 38 jours, sauf dans le vert et le noir.

XXVI. — *Douze tubes de bouillon* ensemencés le 21 décembre avec du *Staphylocoque* (citreus) sont mis 2 au soleil dans chaque serre et 2 en chambre noire, belles cultures dans tous les tubes. Repiquées sur bouillon le 6 janvier, soit le 17e jour. Après environ 100 heures d'insolation et 80 heures de lumière diffuse, repiquage positif pour tous les tubes.

Conclusion. — Le Staphylocoque en bouillon a bien poussé au soleil en lumière blanche et en lumière colorée et a résisté pendant 16 jours.

XXVII. — *Douze tubes de gélose inclinée* ensemencés le 21 décembre avec une culture fraîche de *Staphylocoque* (citreus) sont placés 2 dans chaque serre au soleil et 2 en chambre noire. Le 6 janvier, ils sont repiqués sur tubes de bouillon aussitôt mis à l'étuve.

	CULTURES	DÉBUT	ASPECT le 8e jour	ASPECT le 17e jour	REPIQUAGE
S. blanche.	2	1er j.	Tr. belles, blanches.	Assez belles, un peu sèches, blanches.	2 positifs.
S. bleue...	2	1er j.	Tr. belles, jaunes.	Belles, jaunes.	2 positifs.
S. verte...	2	1er j.	Tr. belles, jaunes.	Belles, jaunes.	2 positifs.
S. jaune...	2	1er j.	Tr. belles, tr. jaunes.	Belles, jaunes.	2 positifs.
S. rouge ..	2	1er j.	Tr. belles, jaunes.	Belles, jaunes.	2 positifs.
Ch. noire.	2	1er j.	Tr. belles, jaunes.	Très belles, jaunes.	2 positifs.

Conclusion. — Sur gélose en tube, le Staphylocoque bien venu partout a résisté partout à 16 jours d'insolation modérée.

Une culture venue blanche dans la serre blanche, repiquée sur un tube de gélose, a donné à l'étuve une culture jaune.

VIBRION CHOLÉRIQUE SUR GÉLOSE ET EN BOUILLON.

XXVIII. — *Douze tubes de gélose inclinée* sont ensemencés le 30 novembre 1916, avec une culture fraîche de *Vibrion cholérique* provenant de l'Institut Pasteur d'Alger et placés dans les serres au soleil et 2 en chambre noire. Repiquage sur bouillon le 6 janvier (38e jour).

	CULTURES	DÉBUT	ASPECT GÉNÉRAL	REPIQUAGE
Serre blanche.	0	»	»	»
Serre bleue. .	2	Le 4e jour.	Assez belles.	Positifs.
Serre verte. .	1	Le 3e jour.	Assez belle.	Positif.
Serre jaune. .	1	Le 3e jour.	Assez belle	Positif.
Serre rouge.	2	Le 4e jour.	Assez belles.	Positifs.
Ch. noire. . .	1	Le 4e jour.	Belle.	Positif.

Conclusion. — Sur tubes de gélose, le Vibrion cholérique bien venu partout sauf dans blanc a résisté partout à 38 jours d'insolation.

XXIX. — *Douze tubes de gélose inclinée*, ensemencés le 21 décembre avec du vibrion cholérique, donnent dans *toutes* les serres, même en lumière blanche, de belles cultures venues dès le 2e jour. Repiquées le 6 janvier, soit le 17e jour, elles donnent *toutes*, à l'étuve, de belles cultures en bouillon.

XXX. — *Douze tubes de bouillon*, ensemencés le 21 décembre avec du vibrion cholérique, donnent dans *toutes* les serres de belles cultures venues dès le 2e jour. Repiquage, le 6 janvier, négatif dans le blanc et le bleu, positif dans le vert, le jaune, le rouge et le noir.

MICROCOCCUS MELITENSIS SUR GÉLOSE ET EN BOUILLON.

XXXI. — *Douze tubes de gélose inclinée* sont ensemencés le 30 novembre avec une culture fraîche de *micrococcus melitensis* et placés 2 dans chaque serre au soleil et 2 en chambre noire. Repiquage sur bouillon le 6 janvier (38e jour).

	CULTURES VENUES	DÉBUT le	ASPECT le 8e jour	ASPECT le 16e jour Culture	Milieu	REPIQUAGE le 38e jour
Serre blanche.	2	3e j.	Belles.	....	....	2 négatifs.
Serre bleue...	1	6e j.	Médiocre.	....	....	Négatif.
Serre verte . .	0	»	»	....	....	»
Serre jaune...	1	6e j.	Assez belle.	....	....	Positif.
Serre rouge...	1	5e j.	Assez belle.	....	....	Positif.
Ch. noire	2	3e j.	1 médiocre. 1 belle.	....	....	2 positifs.

Conclusion. — Sur gélose en tube, développement partout, sauf dans le vert, aussi bien venu dans le blanc que dans le noir, mais plus rapidement détruit.

XXXII. — *Douze tubes en bouillon* sont ensemencés le 20 décembre avec une culture fraîche de *melitensis* poussée en 48 heures à l'étuve et mis 2 dans chaque serre au soleil, et 2 en chambre noire. Repiquage sur bouillon le 10 janvier (21e jour).

	CULTURES VENUES			REPIQUAGE le 10 janvier
Ser. blanche.	2 médiocres.	Le 6 janvier, les cultures venant mal, les 12 tubes sont retirés des serres, et mis à l'étuve, où certaines se mettent à pousser; résultat ci-contre :	2 médiocres.	2 négatifs.
Ser. bleue. .	2 médiocres.		2 médiocres.	2 négatifs.
Ser. verte .	0		»	»
Ser. jaune. .	1 médiocre.		1 as. belle.	Positif.
Ser. rouge. .	0		2 belles.	2 positifs.
Ch. noire . .	0		2 belles.	2 positifs.

Conclusion. — *Microc. melitensis* a médiocrement poussé à la lumière blanche et bleue et y est mort rapidement; il n'a pas poussé dans le rouge et le noir, mais y est resté vivant pendant 20 jours.

XXXIII. — *Douze tubes de gélose inclinée* sont ensemencés le 30 novembre avec une culture fraîche de *paramelitensis* et placés, le 30 novembre, 2 dans chaque serre au soleil et 2 en chambre noire.

	CULTURES VENUES			REPIQUAGE le 10 janvier
Ser. blanche.	2 moyennes.	Le 6 janvier, les 12 tubes, retirés des serres, sont mis à l'étuve et y poussent :	2 moyennes.	2 négatifs.
Ser. bleue. .	0		0	0
Ser. verte . .	1 moyenne.		2 belles.	2 positifs.
Ser. jaune. .	1 belle:		2 belles.	2 positifs.
Ser. rouge. .	0		2 belles.	2 positifs.
Ch. noire . .	0		2 belles.	2 positifs.

COCOBACILLE D'HÉRELLE SUR GÉLOSE.

XXXIV. — *Douze boîtes de gélose* sont ensemencées, le 30 novembre, avec une culture de *cocobacille d'Hérelle* poussée dans le laboratoire à la lumière diffuse et placées dans chaque serre au soleil et 2 en chambre noire.

En même temps, 12 *tests de papier* sont ensemencés, mis en boîte de Petri et placés dans les serres.

SERRES	CULTURES	VENUES	ASPECT le 8e jour.	ASPECT le 15e jour	ASPECT le 30e jour	REPIQUAGES le 6 janvier
S. blanche.	2	2e j.	Tr. belles.	Médiocres.	Desséchées.	2 négatifs.
S. blanche.	2	2e j.	Tr. belles.	Minces, grises.	Médiocres.	2 négatifs.
S. verte ...	2	2e j.	Tr. belles.	Belles, épaisses.	Minces.	2 positifs.
S. jaune...	2	2e j.	Tr. belles.	Très belles.	Minces.	2 négatifs.
S. rouge ..	2	2e j.	Tr. belles.	Belles.	Minces.	2 positifs.
Ch. noire...	2	2e j.	Tr. belles.	Belles.	Minces.	1 pos., 1 nég.

Les tests ont été mis dans des tubes de bouillon, 1 le 21 décembre (21e jour), rien ne pousse sauf dans rouge et noir, l'autre le 6 janvier (38e jour), négatif pour tous.

Conclusion. — Bien venues dans toutes les serres, les cultures de cocobacille se sont assez vite desséchées et stérilisées dans le blanc, le bleu et le jaune. Elles ont résisté à 38 jours d'insolation dans le vert, le rouge et le noir; en test, stérilisation en 21 jours dans blanc, bleu, vert et jaune.

SARCINE SUR GÉLOSE.

XXXV. — *Douze tubes de gélose inclinée* sont ensemencés le 21 décembre avec une culture fraîche de *sarcine rose* provenant d'une angine et placées 2 dans chaque serre et en chambre noire.

	CULTURES VENUES	ASPECT LE 2e JOUR
Serre blanche.	2 le 2e jour.	Très belles, rose pâle.
Serre bleue	2 le 2e jour.	Très belles, rose rouge.
Serre verte.	2 le 2e jour.	Très belles, rose rouge.
Serre jaune	2 le 2e jour.	Très belles, rose rouge.
Serre rouge.	2 le 2e jour.	Très belles, rose rouge.
Chambre noire	2 le 4e jour.	Très belles, rose rouge.

Conclusion. — Sarcine rose bien venue partout, un peu en retard dans le noir, de couleur nettement plus pâle dans le blanc.

Levures sur gélose et moût de raisin.

XXXVI. — Des *levures* importées d'Espagne et de Sicile sur cépages algériens, cultivées à l'Institut Pasteur d'Alger, récemment repiquées sur moût de raisins par M. Alliot, poussées à l'abri de la lumière, à la température du laboratoire, servent à ensemencer, le 30 novembre, des boîtes de gélose additionnée de moût et des tubes de moût et des tests en boîte de Petri que l'on met dans les serres au soleil.

12 boîtes de gélose, 12 tubes de moût et 12 tests de papier sont ensemencés avec une levure d'Alicante.

12 boîtes de gélose avec une levure de grenache et 12 autres avec une levure de Sicile.

Dès le 3e jour, dans toutes les serres, sans distinction, se développent sur gélose de belles cultures, épaisses, blanc crème, et dans les tubes de moût une intense fermentation. Après quelques jours, les cultures sur gélose prennent dans les diverses serres quelques aspects qui les différencient et qui paraissent tenir surtout à la dessiccation plus ou moins grande des cultures et des milieux.

Le 6 janvier, soit le 38e jour, toutes les cultures sont repiquées sur moût de raisin, les tests sont mis en tubes de moût le 21e jour, l'autre le 38e.

Les tableaux ci-dessous résument les résultats de ces expériences.

Conclusion. — Sur les *boîtes de gélose*, belles cultures venues vite partout; arrêtées 2 fois sur 6 et modifiées 4 fois sur 6 dans de la lumière blanche (dessiccation des colonies et du milieu);

Levure d'Alicante sur moût de raisin en tubes.

	FERMENTATION	ASPECT		REPIQUAGE	TESTS REPIQUÉS	
		LE 8e JOUR	LE 15e JOUR	LE 38e JOUR	LE 21e JOUR	LE 38e JOUR
Serre blanche.	2 le 3e jour.	Forte, très trouble.	Très faible; moût clair, décanté.	2 positifs le 2e j.	0	0
Serre bleue. .	2 le 3e jour.	Forte, très trouble.	Faible, demi-clair.	2 positifs le 1er j.	0	0
Serre verte. .	2 le 3e jour.	Forte, très trouble.	Encore fort; moût trouble.	2 positifs le 1er j.	Net le 9e jour.	0
Serre jaune. .	2 le 3e jour.	Forte, très trouble.	Faible, demi-clair.	2 positifs le 1er j.	0	0
Serre rouge. .	2 le 3e jour.	Forte, très trouble.	Faible, demi clair.	2 positifs le 1er j.	Net le 9e jour.	Net le 9e jour.
Ch. noire. . .	2 le 3e jour.	Forte, très trouble.	Forte; moût trouble.	2 positifs le 1er j.	Net le 9e jour.	0

Levure de grenache sur gélose en boîtes de Petri.

	CULTURES	ASPECT		ASPECT LE 30e JOUR		REPIQUAGE
		LE 8e JOUR	LE 15e JOUR	de la culture	du milieu	LE 38e JOUR
Serre blanche.	2 le 3e jour.	2 as. belles, crème.	2 médiocres, jaune.	Médiocres, brunes.	Sec, brun.	2 positifs, le 3e jour.
Serre bleue. .	2 le 3e jour.	2 belles, bl. crème.	2 as. belles, crème.	As. belles, jaunâtres.	Ambré.	2 positifs, le 2e jour.
Serre verte. .	2 le 3e jour.	2 belles, bl. crème.	2 as. belles, crème.	As. belles, jaunâtres.	Ambré.	2 positifs, le 2e jour.
Serre jaune. .	2 le 3e jour.	2 belles, bl. crème.	2 as. belles, crème.	As. belles, jaunâtres.	Ambré.	1 le 3e j., 1 le 6e j.
Serre rouge .	2 le 3e jour.	2 belles, bl. crème.	2 belles, crème.	As. belles, jaunâtres.	Ambré.	1 le 3e j., 1 le 6e j.
Ch. noire. . .	2 le 3e jour.	2 belles, bl. crème.	2 belles, crème.	Belles, crème.	Très clair.	2 le 2e jour.

Levure d'Alicante sur gélose en boîte.

	CULTURES	DÉBUT le	ASPECT LE 10e JOUR	ASPECT LE 30e JOUR de la culture	ASPECT LE 30e JOUR du milieu	REPIQUAGE LE 38e JOUR
Serre blanche.	2 belles.	3e jour.	1 médiocre. 1 assez belle.	1 presque disparue. 1 médiocre, brune.	Jaune. Très sec.	1 négatif. 1 positif, le 7e j.
Serre bleue. .	2 belles.	3e jour.	2 très belles.	2 assez belles, crème, aplaties	Jaune clair, sec.	2 positifs, le 3e j.
Serre verte. .	2 belles.	3e jour.	2 très belles.	2 assez belles, crème, aplaties.	Jaune tr. clair, peu sec.	2 positifs, le 3e j.
Serre jaune. .	2 belles.	3e jour.	2 très belles.	2 assez belles, crème, aplaties.	Jaune clair, sec.	2 positifs, le 4e j.
Serre rouge. .	2 belles.	3e jour.	2 très belles.	2 assez belles, crème, aplaties.	Jaune clair, sec.	2 positifs, le 3e j
Ch. noire . . .	2 belles.	3e jour.	2 très belles.	2 belles, épaisses, blanc crème.	Jaune tr. clair, peu sec.	2 positifs, le 3e j.

Levure de Sicile sur gélose en boîtes de Petri.

	CULTURES	ASPECT LE 8e JOUR	ASPECT LE 15e JOUR	ASPECT LE 30e JOUR de la culture	ASPECT LE 30e JOUR du milieu	REPIQUAGE LE 38e JOUR
Serre blanche.	2 le 3e jour.	2 tr. belles, bl. crème.	2 belles, jaunâtres.	Assez belles, aplaties, brunes.	Jaune.	1 négatif; 1 positif, le 3e jour.
Serre bleue. .	2 le 3e jour.	2 tr. belles, bl. crème.	2 tr. belles, crème.	Belles, épaisses, jaune clair.	Jaune clair	2 positifs, le 2e jour.
Serre verte. .	2 le 3e jour.	2 tr. belles, bl. crème.	2 tr. belles, crème.		Jaune clair	2 pos.; 1 le 2e j., 1 le 6e j.
Serre jaune. .	2 le 3e jour.	2 tr. belles, bl. crème.	2 tr. belles, crème.		Jaune clair.	2 positifs, le 2e jour.
Serre rouge	2 le 3e jour.	2 tr. belles, bl. crème.	2 tr. belles, crème.		Jaune clair	2 positifs, le 2e jour.
Ch. noire. . .	2 le 3e jour.	2 tr. belles, bl. crème.	2 tr. belles, crème.	Très belles, crème.	Très clair.	2 positifs, le 2e jour

continuées dans les autres, après le 10e jour, les cultures sont un peu aplaties, surtout dans le blanc et le bleu. Levures vivantes partout, après 38 jours, sauf 2 sur 6, en serre blanche.

En *tubes de moût*, fermentation intense partout; légèrement accélérée à la lumière, surtout dans blanc. Levures vivantes, après 38 jours, dans tous les tubes.

Les *tests* ont été stérilisés en 21 jours dans blanc, bleu et jaune et en 38 jours dans toutes les serres. Les levures paraissent particulièrement sensibles à la dessiccation.

* * *

De ces diverses expériences, nous retiendrons les données générales suivantes : la lumière solaire n'est bactéricide qu'avec de longues ou fortes insolations directes; elle agit surtout en surface sur les milieux secs et dans l'air où les bactéries sont le plus exposées au rayonnement et à la dessiccation. En milieu liquide les bactéries ne sont détruites qu'avec les plus fortes intensités et sous de très faibles épaisseurs. La lumière blanche totale est de beaucoup plus active que les lumières partielles quelles qu'elles soient; la lumière diffuse est insuffisante; la lumière bleue est légèrement plus bactéricide que les autres lumières de couleur, mais beaucoup moins que la lumière blanche. Après elle vient le jaune, puis le rouge et en dernier le vert qui, pour les bactéries comme pour les plantes, est le plus voisin du noir.

La partie la plus active du spectre solaire est la partie lumineuse, l'ultra-violet a une faible part dans les effets bactéricides de la lumière solaire; la filtration par un verre épais qui retient la plus grande partie de l'ultra-violet solaire n'a pas sensiblement diminué ces effets.

Il en est de même de l'infra-rouge; la filtration de la lumière solaire par une nappe d'eau n'a pas empêché son action bactéricide de s'exercer. La chaleur joue cependant un certain rôle; le refroidissement par la glace pendant l'insolation a retardé la mort des bactéries et la dessiccation des milieux.

Le pouvoir bactéricide des radiations paraît lié à la fois à leur action chimique et à leur action déshydratante (du protoplasme et du milieu nutritif) et plus particulièrement, croyons-nous, à cette dernière, qui pourtant n'est pas exclusive,

puisqu'elle ne peut s'exercer efficacement dans les milieux liquides ou fortement hydratés. Dans ce cas, elle serait due à une sorte de choc cinétique ou d'intoxication par excès d'énergie.

En dernière analyse, il semble que la mort des bactéries au soleil est due à une absorption trop grande d'énergie dont le premier effet le plus souvent est la déshydratation et la coagulation du protoplasme.

L'énergie absorbée étant seule agissante, les rayons de plus courte longueur d'onde, dits chimiques, sont en surface les plus actifs vraisemblablement parce que les plus absorbés par les bactéries et les milieux. En profondeur au contraire, les rayons calorifiques plus pénétrants seraient plus efficaces, mais ne peuvent produire d'effets bactéricides en raison de leur filtration progressive et de leur faible densité.

Toutes les radiations d'ailleurs, comme toutes les formes d'énergie, sont, suivant la dose absorbée, destructives ou excitantes pour le protoplasme vivant, donc pour les bactéries, et il n'y a pas là à proprement parler d'action spécifique.

Dans l'effet bactéricide il faut aussi tenir compte de la mise à nu, de l'exposition à l'air qui accompagne généralement la mise au soleil et qui contribue puissamment à la dessiccation des bactéries et des milieux.

Pratiquement, en hygiène et en thérapeutique il serait vain de compter beaucoup (surtout dans les régions tempérées) sur l'action bactéricide directe de la lumière solaire, qui ne peut s'exercer en profondeur au delà de quelques millimètres ; nous avons vu que les colonies microbiennes protégées par de minces lames de graisse ou de muscle résistent aux plus fortes insolations.

En héliothérapie, l'action bactéricide directe des rayons solaires n'est importante que pour le traitement des plaies superficielles, des brûlures, des affections cutanées ; elle ne peut s'exercer sur les organes profonds, poumons, squelette, etc. La cure solaire cependant agit aussi, le fait est cliniquement démontré, sur les bactéries incluses dans les tissus ; tout porte à croire que c'est là un effet indirect résultant de l'action biotique de la lumière solaire sur les tissus vivants, action générale et locale, action excitante, énergétique dont l'importance thérapeutique ne saurait être exagérée, qui est produite par toutes

les radiations lumineuses et qui se traduit notamment par une suractivité circulatoire et fonctionnelle des organes, et par une augmentation de leurs moyens de défense.

Cette manière de voir, concernant à la fois le rôle restreint de l'action bactéricide et de l'ultra-violet, le rôle prépondérant de l'action biotique et des rayons lumineux et calorifiques dans la cure solaire, était en 1911, quand nous l'avons indiquée (1), tout à fait en contradiction avec l'opinion générale.

Elle n'est pas encore généralement admise, mais elle tend à l'être en certains points par nombre d'auteurs des plus avertis.

A la Société de Chirurgie (16 mai 1917), M. Leriche et M. Sencert ont expliqué la stérilisation des plaies au soleil par l'exsudation séreuse et la phagocytose que provoquent les radiations; M. Quénu et M. Chaput ont montré le rôle de la chaleur et de l'hyperémie; M. Delbet a insisté sur ce fait que l'action principale de la cure solaire est non pas une action bactéricide au sens ordinaire du mot, mais un renforcement des moyens de défense naturels; les microbes (ainsi que l'ont montré les examens bactériologiques de M. Leriche, de M. Sencert et de M. Delbet), qui avant le traitement sont presque tous extra-cellulaires, sont après l'insolation presque tous phagocytés.

Cette doctrine nouvelle n'a pas seulement un intérêt théorique. Elle conduit suivant nous à de multiples et importantes applications dans la pratique de l'héliothérapie; applications sur lesquelles nous avons par ailleurs maintes fois insisté (2) et qui concernent notamment l'utilisation de filtres comme en radiologie pour le dosage et la graduation de l'insolation locale et générale, l'importance thérapeutique de cette dernière, la continuité des traitements assurée, malgré la température et les saisons, par l'installation de galeries vitrées, et la suppléance éventuelle du soleil dans les serres comme en horticulture par des sources artificielles de chaleur et de lumière.

(1) MIRAMOND DE LAROQUETTE, Action des bains de lumière naturelle et artificielle. Rapport au Congrès de l'A. F. A. S., *Arch. d'Élec. méd.*, 25 juillet 1911.

(2) Sur l'Érythème solaire et la pigmentation. Congrès de Radiologie de Prague, 1912. *Monde médical*, p. 1097, 1912.

Sur l'absorption du rayonnement solaire par la peau et son utilisation dans l'économie animale. *Bulletin de la Soc. de Pathologie exotique*, 13 mai 1914.

Action biotique de la lumière solaire; cure solaire des blessés en hiver. *Bulletin de l'Acad. de Médecine*, novembre 1915.

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

32e ANNÉE MAI 1918 N° 5

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de E. Metchnikoff.

DES VIRUS SENSIBILISÉS

VACCINATION ANTIPARATYPHIQUE B

par A. BESREDKA et Mlle S. BASSECHES.

Les vaccins sensibilisés, nés en 1902, ont acquis leurs droits de cité en bactériologie. A l'heure actuelle il reste peu de microbes pathogènes qui aient échappé aux tentatives de sensibilisation (1). Beaucoup de ces vaccins sont déjà consacrés par l'usage courant (2).

Tous ceux qui ont eu à contrôler leurs effets, tant au laboratoire que dans la pratique, s'accordent à leur reconnaître une supériorité sur les vaccins ordinaires, supériorité qui se traduit d'abord par leur innocuité, puis par leur action qui est à la fois rapide, sûre et durable. Mais, comme il arrive fréquemment en pareil cas, au fur et à mesure que le champ de leur application s'était élargi, le principe qui a présidé à leur préparation s'estompant dans le temps, il fut commis des fautes de technique, susceptibles de compromettre leur réputation.

(1) *Bullet. de l'Institut Pasteur*, t. VIII, 30 mars 1910; t. X, 30 juin 1912.
(2) *Biologica*, 15 mai 1914; *Berlin. klin. Woch.*, n° 3, 1914.

Ayant constaté jusque dans notre propre entourage de ces fautes, nous avons cru utile d'entreprendre de nouvelles expériences, pour mieux faire ressortir l'idée devant dominer leur préparation. Nous nous sommes adressés au bacille paratyphique B : parmi les microbes pathogènes, c'est un des rares qui n'aient pas encore été étudiés. Nous n'avons pas eu à nous repentir du choix, cette étude nous ayant permis de constater, chemin faisant, des faits d'intérêt général.

Rappelons que dans notre première note (1) nous avons montré que, si les vaccins sensibilisés sont supérieurs aux vaccins ordinaires par leur innocuité et la rapidité d'action, ils ont surtout ce grand avantage sur la séro-vaccination qu'ils créent une véritable immunité active et non pas une immunité passive de courte durée, comme c'est le cas dans la vaccination par mélange de sérum et de microbes. C'est précisément pour ne pas tomber dans l'immunité passive que nous avons tant insisté sur la nécessité de débarrasser le vaccin sensibilisé des moindres traces de sérum libre, à l'aide de lavages répétés.

Aujourd'hui on est unanime à trouver peu rationnelle la séro-vaccination, c'est-à-dire la vaccination par des microbes en présence du sérum spécifique; mais ce dont on ne paraît pas se douter, c'est à quel point les traces de sérum libre, si faibles soient-elles, compromettent l'immunité active, tant au point de vue de sa durée qu'au point de vue de sa solidité.

*
* *

Pour nous rendre compte des avantages et des inconvénients de différents modes de vaccination, nous avons essayé, chez des souris, à titre de vaccins, les préparations suivantes :

1° Des *bacilles paratyphiques vivants, non sensibilisés*;

2° Des *bacilles paratyphiques morts, non sensibilisés*;

3° Des *bacilles paratyphiques vivants, en présence de quantités variables de sérum antiparatyphique*;

4° Des *bacilles paratyphiques morts, en présence de quantités variables de sérum antiparatyphique*;

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 2 juin 1902.

5° Des *bacilles paratyphiques vivants sensibilisés.*

Toutes ces préparations étaient introduites sous la peau.

6° Dans une dernière série d'expériences, nous avons essayé de vacciner les souris *par la voie buccale*, tantôt avec des bacilles paratyphiques vivants ou morts, tantôt avec des bacilles paratyphiques vivants sensibilisés.

Pour ne pas alourdir l'exposé, nous choisirons dans chacun des six groupes de vaccins une seule expérience plus ou moins typique que nous rapporterons avec quelques détails.

Au cours de ces recherches qui étaient échelonnées sur une étendue de plus d'une année, nous avons vu le bacille paratyphique B varier quelquefois de virulence. La dose mortelle qui était, en général, en injection sous-cutanée, égale, pour les souris de 15 à 18 grammes, à 1/100 de culture sur gélose de 24 heures, atteignait quelquefois 1/2.000 et même 1/8.000 de culture.

Le sérum qui a servi, au cours de toutes ces expériences, soit à sensibiliser les microbes, soit à être injecté tel quel, en même temps que les microbes ou séparément d'eux, provenait des lapins qui ont reçu, en l'espace de 3 semaines, 4 injections dans les veines (0 c.c. 25 et 0 c.c. 5 d'émulsion de bacilles chauffés, puis 0 c.c. 5 et 1 cent. cube d'émulsion de bacilles vivants, une culture sur gélose étant diluée dans 10 cent. cubes d'eau physiologique).

Le sérum des lapins ainsi préparés s'est montré particulièrement actif. A la dose de 1/50 de cent. cube injecté sous la peau des souris, ce sérum antiparatyphique protégeait sûrement contre une et même plusieurs doses mortelles de bacilles paratyphiques vivants injectés 24 heures après. Les doses plus faibles de sérum (1/100-1/200 de cent. cube) ne donnaient qu'une survie de 5 à 6 jours.

Ce sérum possédait, en plus, grâce à l'immunisation par la voie veineuse, un pouvoir antiendotoxique (1) très marqué. La dose mortelle de bacilles paratyphiques chauffés (60° — 30′), étant, en injection sous-cutanée, de 1/10 de culture sur gélose, ce sérum protégeait la souris, à la dose de 1/10 de cent. cube, contre

(1) *Ces Annales*, t. XX, février 1906, p. 149.

1/5 de culture chauffée (2 doses mortelles). Des souris recevant sous la peau 1 cent. cube de sérum résistaient, sans le moindre trouble, à l'injection sous-cutanée d'une culture entière (10 doses mortelles) de bacilles paratyphiques chauffés.

* * *

1° *Bacilles paratyphiques vivants non sensibilisés.*

21 *mars*. — A quatre souris il est inoculé sous la peau 1/2.000 de culture paratyphique vivante de 24 heures, ce qui est la dose mortelle limite.

23 *mars*. — Sur ces quatre souris, deux meurent après 24 et 48 heures. Les deux autres survivent et vont très bien.

25 *mars*. — A ces deux souris qui ont survécu, ainsi qu'à une souris neuve, témoin, il est inoculé 1/100 de culture paratyphique vivante de 24 heures sous la peau.

Le témoin meurt le lendemain (26 mars). Les deux souris ayant reçu, à titre de vaccin, des bacilles paratyphiques vivants 4 jours auparavant, survivent d'abord, puis finissent par succomber à l'infection paratyphique, une après une survie de 2 jours sur le témoin, l'autre après une survie de 5 jours.

Il résulte de cette expérience que, en cas de vaccination avec du virus paratyphique vivant, l'immunité n'est pas acquise après 4 jours. Il y a, en plus, à tenir compte du risque qu'un pareil vaccin fait courir en raison de sa virulence propre.

* * *

2° *Bacilles paratyphiques morts non sensibilisés.*

19 *mars*. — A quatre souris il est injecté sous la peau des doses variables de culture paratyphique chauffée à 60° pendant 30 minutes : 1/100, 1/50, 1/10, 1/5 de culture de 24 heures sur gélose.

21 *mars*. — Seules survivent les souris ayant reçu 1/100 et 1/10 de culture, les autres ayant succombé à l'intoxication en 24 et 48 heures.

25 *mars*. — Aux deux souris survivantes, ainsi qu'à une troisième souris témoin, il est inoculé 1/100 de culture paratyphique vivante de 24 heures.

La souris témoin est morte le lendemain ; les deux autres ont survécu d'une façon définitive.

Donc, le vaccin constitué par des bacilles paratyphiques chauffés est doué d'une toxicité assez élevée, en injection sous-cutanée ; il confère une immunité solide pouvant être constatée après 6 jours.

*
* *

3° *Bacilles paratyphiques vivants en présence de sérum antiparatyphique.*

5 *mars.* — A trois souris il est injecté sous la peau du dos 1/10 de cent. cube de sérum antiparatyphique.

6 *mars.* — On inocule à ces trois souris des doses variables de culture paratyphique vivante :

1° 1/100 de culture (rouge),
2° 1/25 de culture (bleue),
3° 1/10 de culture (blanche).

Trois souris témoins sont inoculées avec 1/100, 1/200, 1/500 de cette même culture en vue du dosage de la virulence. Sur ces trois témoins, deux meurent le lendemain; la troisième souris qui a reçu 1/500 de culture est bien malade le lendemain; elle est trouvée morte le surlendemain matin. La dose mortelle de la culture employée est donc de 1/500 de culture. Or, parmi les souris ayant été préparées la veille (5 mars) avec 1/10 de cent. cube de sérum antiparatyphique, aucune n'a été malade, bien qu'elles aient reçu 5 (rouge), 20 (bleue) et 50 (blanche) doses mortelles.

14 *mars.* — A ces trois souris ayant survécu, à la faveur du sérum, il a été inoculé 1/100 de culture. Le lendemain et le surlendemain sont mortes les deux souris qui ont reçu 5 (rouge) et 20 (bleue) doses mortelles; celle qui a reçu 50 doses mortelles (blanche) a été malade pendant deux jours, puis elle a fini par se remettre.

Il ressort de cette expérience qu'une souris a beau avoir résisté, à la faveur du sérum, jusqu'à 50 doses mortelles de virus paratyphique vivant; il suffit qu'elle ait reçu du sérum, fût-ce même la veille de l'inoculation des microbes, pour que le caractère de son immunité se trouve transformé : au bout de huit jours celle-ci, devenue passive, est réduite à zéro.

Autre expérience :

16 *mars.* — Deux souris reçoivent sous la peau du dos 1/50 de cent. cube (bleue) et 1/10 de cent. cube (blanche) de sérum antiparatyphique.

17 *mars.* — A ces deux souris, ainsi qu'à une souris témoin, il est inoculé 1/100 de culture paratyphique vivante. La souris témoin meurt le lendemain, les deux autres survivent sans présenter aucun trouble.

25 *mars.* — Aux deux souris survivantes ayant résisté, à la faveur du sérum, à 1/100 de culture, 8 jours auparavant, on inocule de nouveau 1/100 de culture paratyphique. Un témoin en reçoit autant.

26 *mars.* — La souris (blanche) qui avait reçu le 16 mars la plus forte dose de sérum (1/10 de cent. cube) meurt en même temps que le témoin, 24 heures après l'inoculation. La souris (bleue) qui avait reçu le 16 mars moins de sérum (1/50) n'est morte que 48 heures après.

Il s'ensuit donc que la souris, qui a subi une fois victorieusement une infection paratyphique mortelle grâce à la petite quantité de sérum reçue la veille, se comporte, déjà 8 jours après, comme une souris neuve, en présence de la même dose de virus. L'expérience montre, de plus, que la souris résiste d'autant moins à la seconde épreuve que la dose de sérum reçue avait été plus forte.

* * *

4° *Bacilles paratyphiques morts en présence de sérum antiparatyphique.*

21 *mars.* — Quatre souris reçoivent :

1° 1/10 de culture paratyphique chauffée (rouge queue);
2° 1/50 de culture paratyphique chauffée (rouge tête);
3° Un mélange { 1/5 de culture paratyphique chauffée (bleue), 1/10 de cent. cube de sérum antiparatyphique,
4° Un mélange { 1 culture entière paratyphique chauffée (jaune), 1 cent. cube de sérum antiparatyphique.

23 *mars.* Seule est trouvée morte la souris qui a reçu 1/10 de culture chauffée (rouge queue); les autres vont bien.

31 *mars.* — Les trois souris survivantes sont éprouvées avec 1/100 de culture paratyphique vivante, en injection sous-cutanée.

La souris qui a reçu le 21 mars 1/50 de culture chauffée (rouge tête) a eu survie définitive.

La souris qui a reçu le 21 mars 1/5 de culture chauffée (bleue) en même temps que 1/10 de sérum est morte le 4 avril.

La souris qui a reçu le 21 mars 1 culture entière chauffée (jaune) en même temps que 1 cent. cube de sérum est morte le 2 avril, presque en même temps que le témoin.

Donc, alors que 1/50 de culture chauffée, injectée seule, vaccine la souris solidement contre le virus paratyphique, des doses 10 et même 50 fois plus forte de vaccin ne confèrent aucune immunité pour peu qu'elles renferment un peu de sérum. De plus, l'immunité est d'autant plus fragile que la dose de sérum ajoutée au vaccin avait été plus forte.

* * *

5° *Bacilles paratyphiques vivants sensibilisés.*

Une culture paratyphique sur gélose inclinée, dont 1/500 tue la souris en moins de 24 heures, est diluée dans 1 cent. cube d'eau physiologique. Cette

émulsion, très chargée de bacilles, est additionnée de 1 cent. cube de sérum antiparatyphique de lapin (voir plus haut). Le tout est laissé au contact, à la température du laboratoire, pendant une nuit. Le lendemain, le sérum est décanté; le dépôt microbien est lavé deux fois à l'eau physiologique (30 cent. cubes), de façon à en chasser la moindre trace de sérum libre.

En éprouvant la virulence de la culture ainsi traitée, on constate que les souris supportent jusqu'à 1/4 de culture entière, en injection sous-cutanée.

26 *février*. — Il est injecté à 20 souris, sous la peau, des bacilles paratyphiques vivants sensibilisés, à des doses variant de 1/10 à 1/4 de culture.

27 *février*. — A partir de ce jour et les jours suivants, on inocule à 2 souris préparées et à 1 souris neuve 1/100 de culture paratyphique vivante.

Sans entrer dans les détails, disons qu'à l'exception d'une souris qui est morte au 5e jour de l'infection, toutes les autres ont survécu. Par contre, toutes les souris témoins sont mortes en moins de 24 heures.

5 souris vaccinées ont résisté à des doses de virus allant jusqu'à 1/10 de culture vivante, et cela 1 mois et demi après avoir été vaccinées.

Il résulte de l'ensemble de ces expériences que :

a) Le virus paratyphique B subit, par suite de la sensibilisation, une atténuation de virulence, qui est de plus de 100 fois par rapport au virus non sensibilisé;

b) Les bacilles paratyphiques vivants sensibilisés protègent contre plusieurs — jusqu'à 50 — doses mortelles de virus paratyphique virulent ordinaire;

c) L'immunité conférée par les bacilles paratyphiques sensibilisés est une immunité active. Elle s'établit dès le lendemain de l'injection vaccinale.

*
* *

6° *Bacilles paratyphiques, vivants ou morts, donnés par ingestion.*

Pour compléter cette étude, nous avons voulu nous rendre compte de la valeur de ces différents vaccins, lorsque la souris est infectée, non pas par injection, mais par ingestion.

Disons de suite que nous avons dû y renoncer. Nous avons cherché vainement à établir la dose buccale mortelle : bien que notre paratyphique fût isolé de l'épidémie si meurtrière de Wrexham, toutes nos tentatives pour infecter les souris par la bouche ont échoué. Nous avons administré aux souris par la bouche jusqu'à II et III grosses gouttes d'une culture sur gélose diluée dans 1 cent. cube d'eau physiologique, sans provoquer chez elles le moindre trouble, même passager. Le

résultat fut le même, qu'il s'agît des bacilles paratyphiques vivants, des bacilles morts ou des bacilles sensibilisés vivants.

Un jour, manquant de souris neuves pour une expérience de contrôle, nous eûmes l'idée d'utiliser une souris qui avait reçu, un mois auparavant, des bacilles paratyphiques par la bouche. Quelle ne fut donc pas notre surprise lorsque, le lendemain, nous constatâmes que cette souris, à laquelle nous avions injecté la veille 1/100 de culture paratyphique virulente, donc une dose sûrement mortelle, grignotait gaiement ses grains, comme si elle n'avait rien reçu. Croyant qu'il y avait eu erreur, nous éprouvâmes d'autres souris du même lot : même survie. En présence de ce résultat inattendu, nous reprîmes l'expérience sur des centaines de souris, en faisant varier les virus (bacilles morts, vivants, sensibilisés vivants et sensibilisés chauffés) et les intervalles entre l'ingestion et l'injection d'épreuve.

Voici ce que cette expérience a montré :

Pendant les 10 premiers jours qui suivent l'ingestion du virus, que celui-ci ait été chauffé, vivant ou sensibilisé, les souris succombent à l'injection d'épreuve, tout comme les témoins.

A partir du 10e jour et pendant 1 mois et demi environ qui suivent le repas paratyphique B, quel qu'il soit, à la condition que celui-ci ait été copieux, les souris sont immunisées contre une et même plusieurs doses mortelles de virus paratyphique injecté sous la peau.

Notons cependant que les souris vaccinées par la voie buccale sont d'autant plus solidement immunisées que les bacilles ingérés avaient été plus virulents. Ainsi les souris les mieux vaccinées sont celles qui avaient reçu par la bouche des bacilles paratyphiques vivants et virulents; celles-là sont capables de résister à plusieurs doses mortelles de virus paratyphique sous la peau. Suivent dans l'ordre d'immunité décroissante les souris qui avaient reçu par la bouche des bacilles vivants sensibilisés. Enfin, les souris auxquelles on avait fait ingérer des bacilles paratyphiques tués par la chaleur possèdent une immunité la moins solide : elles peuvent résister tout au plus, pas toujours, à une dose de virus simplement mortelle.

En résumé :

1° Le vaccin constitué par des bacilles paratyphiques vivants ne confère l'immunité qu'à la longue; il est d'un maniement délicat en raison de sa virulence, susceptible de s'exalter sans raison précise.

2° Le vaccin constitué par des bacilles paratyphiques tués confère une immunité solide, ne s'établissant guère avant 4 à 5 jours; ce vaccin est doué d'un pouvoir toxique considérable.

3° Le vaccin constitué par des bacilles paratyphiques vivants sensibilisés confère l'immunité dès le lendemain; ce vaccin n'est ni virulent, ni toxique.

4° A l'encontre de ces préparations qui créent une immunité active, solide et durant des mois, celles auxquelles on associe du sérum antiparatyphique confèrent une immunité éphémère, qui l'est d'autant plus que la préparation renferme plus de sérum. Un vaccin peut renfermer une quantité énorme de corps de microbes; pour peu qu'il contienne des traces de sérum, l'immunité qui en résulte n'est plus active : elle est passive.

5° L'immunité, à la suite de l'ingestion par la voie buccale, s'établit tardivement. Très solide en cas d'ingestion de microbes vivants, elle est fragile et, d'ailleurs, aléatoire en cas d'administration de microbes morts.

Paris, 16 mai 1914.

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET EXPÉRIMENTALE D'UN *OOSPORA* PATHOGÈNE

(*OOSPORA PERIERI* MATRUCHOT ET ANTOINE)

par Édouard ANTOINE,
Interne des Hôpitaux de Paris.

Une épaisse fausse membrane recouvrait une des plaies chez un blessé atteint de fracture du péroné par éclat d'obus. Les cultures de cette fausse membrane ont permis d'isoler un nouveau champignon parasite, qui rentre dans le genre *Oospora*, et dont nous avons pu faire l'étude (1).

Étude clinique.

C..., n° 12, salle n° 1. — A son arrivée, le 4 novembre 1916, le blessé, qui avait fait un séjour de plusieurs semaines dans les hôpitaux de l'avant, présentait deux plaies de la jambe droite ; l'une, située face externe du péroné au niveau de la fracture, est recouverte d'une *fausse membrane* épaisse de plusieurs millimètres, gris jaunâtre, ayant une consistance assez grande. Le pansement est abondamment souillé de pus. L'examen microscopique d'un débris de cette fausse membrane, adhérente et qu'il faut arracher à la pince, montre une masse de filaments très fins et ramifiés, au milieu desquels on voit des polynucléaires, des mononucléaires et de très nombreux éléments ronds (levures ou spores?) ; pas de microbes. La plaie, qui n'a aucune tendance à guérir spontanément, est traitée par le liquide de Gram ; elle se déterge alors rapidement et cicatrise en quelques jours.

Le 25 novembre, le blessé se met à marcher. On lui fait en outre du massage.

Il se forme en quelques jours une tuméfaction grosse comme une petite noix, fluctuante profondément contre le péroné et sous la cicatrice. La pression est douloureuse. La température, qui était matin et soir au-dessous de 37°, oscille alors autour de 37°5-37°6.

Une ponction exploratrice, pratiquée à ce niveau, ramène quelques gouttes de liquide sanguinolent, et 5 centimètres cubes d'électrargol sont injectés à la place. La tuméfaction se résorbe en cinq ou six jours et la guérison est dès lors définitive. L'examen du liquide retiré par la ponction montre des éléments ronds, comme des levures.

(1) Je remercie vivement M. le professeur Matruchot et le Dr Pinoy pour les excellents conseils qu'ils ont bien voulu me donner au cours de cette étude.

Cliniquement, il s'agit donc d'un véritable cas de « muguet des plaies ».

L'ensemencement de la fausse membrane et du liquide retiré par ponction a donné sur carotte et betterave glycérinées des cultures typiques d'un champignon imparfait du groupe des Hyphomycètes que M. le professeur Matruchot a bien voulu nous aider à étudier et qu'il rattache au genre *Oospora*. Nous l'avons appelé « *Oospora Perieri* » (1).

Étude morphologique.

Ce champignon pousse très facilement sur les différents milieux de culture usuels. Mais, suivant la nature du milieu et les conditions extérieures, il peut revêtir plusieurs formes de développement. Nous en avons pu isoler trois qui ont chacune leurs caractères propres :

1° *Forme* « *levure* » ;
2° *Forme* « *bouture* » ;
3° *Forme* « *mycélienne* » ;

Sur beaucoup de milieux, ces formes peuvent être associées. En outre il nous a été facile de constater la transformation en série d'une forme dans l'autre, suivant les milieux de culture et les conditions de développement. C'est ainsi que, suivant les circonstances, la forme « levure » peut se transformer en forme « bouture » ou en forme « mycélienne » et réciproquement, suivant que le champignon est injecté dans le muscle d'un cobaye ou ensemencé sur une carotte ou en profondeur dans un bouillon.

La forme « bouture » étant celle qui permet de caractériser le mieux l'*Oospora Perieri*, nous la prendrons comme type de description.

(1) *Un champignon infectant des plaies de guerre — Oospora Perieri Matruchot et Antoine* (Communication faite à la Société de pathologie comparée, 13 novembre 1917, avec une figure dans le texte) : « Ce champignon appartient aux *Fungi Imperfecti* et rentre dans le groupe des Mucédinées Hyalosporées, famille des Oosporées, ses affinités les plus étroites sont avec le genre *Oospora*, où il se place au voisinage de l'*Oospora lactis* Fras. (anciennement *Oïdium lactis*) et de l'*O. variabilis* Lindner.

1° *Forme « bouture ».*

Lorsqu'on ensemence l'*Oospora* sur une carotte, une betterave glycérinée, ou sur gélatine, il se développe en quarante-huit heures, à la température de 16 à 18°, sous l'aspect de petites

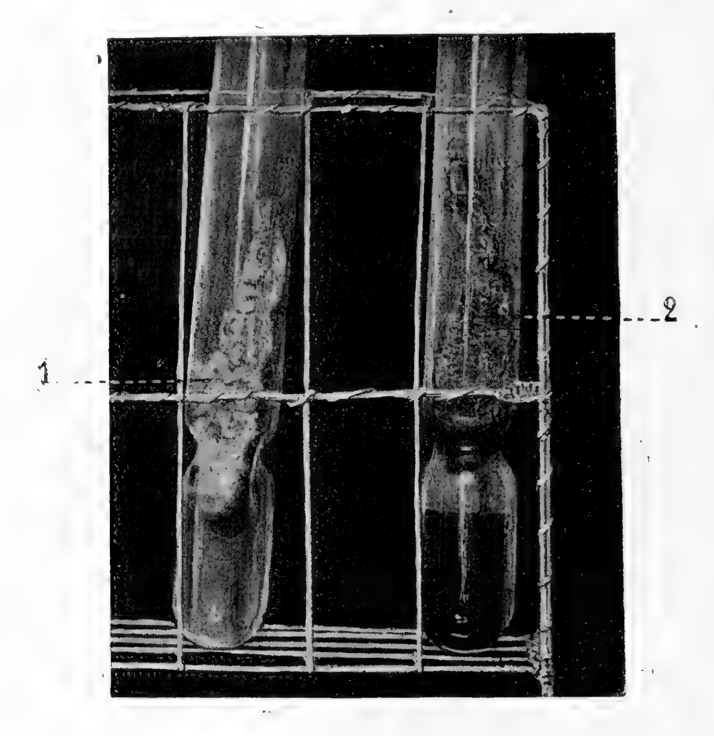


Fig. 1. — *Oospora Perieri* : Culture de 3 semaines.
1, Sur carotte (culture blanc ocreux); 2, Sur betterave (culture rose).

excroissances sphériques, véruqueuses, légèrement déprimées au centre, de couleur opaline, qui s'accroissent de plus en plus. Les colonies ne tardent pas à s'agglomérer, finissant par former en quelques jours des cordons blanchâtres, ocreux, qui se plissent; l'ensemble représente assez bien une masse vermiculée comme des circonvolutions cérébrales (voir fig. 1). Parfois de la partie la plus saillante de ces amas poussent de petits piquants hérissés qui ne sont que certains éléments plus abon-

damment développés. Ces colonies sont jaunâtres en général; mais leur coloration semble conditionnée par le milieu de culture lui-même, qui cède des pigments. C'est ainsi que sur la betterave les colonies sont rosées, et que sur la carotte elles sont franchement jaune ocreux. C'est sur les lames en boîte Borrel que l'examen microscopique permet de déceler le mode de développement de ce champignon.

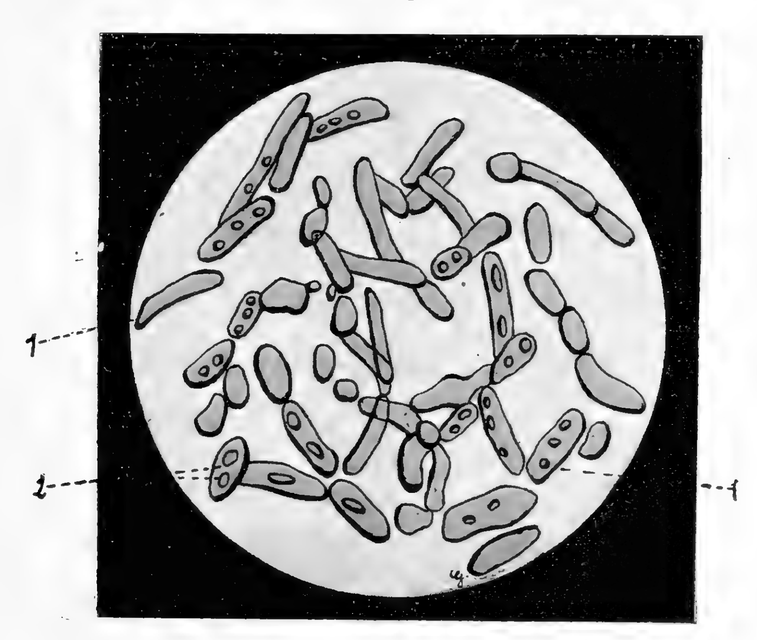


Fig. 2. — *Oospora Perieri* : Culture en bouillon sucré; pellicule en surface.

1, Eléments Levure allongés; 2, Globules réfringents de graisse. — Gross. : 1.323.

« Sur les lames en boîte Borrel, on voit, dans les cas les plus favorables, le mycélium végétatif, formé de cellules courtes et ovales, bourgeonner, sur le flanc de celles-ci, de courts chapelets de conidies, à formation basifuge, qui restent simples. Ces chapelets sont *disposés en cyme* sur le mycélium végétatif, et c'est là un caractère très net chez ce champignon » (1). (Voir la figure 3 ci-contre et la figure 1 de la note de MM. Ma-

(1) Matruchot et Antoine, *loco citato*.

truchot et Antoine). Les segments articulés mesurent de 1 à 2 μ de large, et de 6 à 7 μ de long. Les spores ont 2 à 3 μ de long sur 1 μ de large.

2° *Forme « levure ».*

L'*Oospora* prend l'aspect « levure » dans le pus des abcès en goutte pendante ou sur la gélose Sabouraud. D'autres fois les éléments « levure » se trouvent mêlés en proportion variable avec les éléments « bouture » comme dans les cultures sur carotte, betterave, blé, pomme de terre.

Ce sont des éléments ronds (fig. 4) ou ovales (fig. 3), de la dimension moyenne de 1 à 2 μ, atteignant parfois jusqu'à 4 ou 5 μ, qui se présentent le plus souvent groupés en amas. Il n'est pas rare de voir des éléments en voie de reproduction par bourgeonnement ou bien par scissiparité. Dans les cultures âgées de plusieurs semaines, il se forme dans le protoplasma des levures des petits grains plus réfringents qui paraissent être des amas graisseux (voir fig. 3 et 4).

3° *Forme « mycélienne ».*

Ensemencé dans un bouillon de légumes sucré, l'*Oospora* se développe :

1° En surface formant une pellicule blanchâtre de levures;

2° En profondeur, contre la paroi du tube se forment en plusieurs points des petites masses d'O. Ces petites masses sphériques sont brillantes, formant comme des petites étoiles en suspension dans le liquide. L'examen microscopique d'une de ces petite sphères montre qu'elles sont constituées par un feutrage de longs éléments mycéliens. De tout le pourtour de la petite masse se détachent de très beaux et longs filaments cloisonnés et ramifiés. Très rarement on voit des chlamydospores. De ces filaments se détachent latéralement des fruits directement du mycélium sans conidiophores ; parfois l'extrémité même du filament porte un fruit terminal (voir la fig. 5). C'est la vraie *forme d'épanouissement.*

Sur un tube de sérum coagulé, nous avons pu voir se développer, sur la surface même du sérum, puis remontant sur la

paroi du tube, des hyphes rampantes, cloisonnées, parallèles, formant un feutrage épais, blanchâtre. Ces filaments mesurent de 1 à 3 μ de diamètre et les spores de 1 à 2 μ.

Les aspects morphologiques de l'O. sont donc extrêmement variés suivant les milieux de culture; aussi la classification de ce champignon présente-t-elle quelques difficultés.

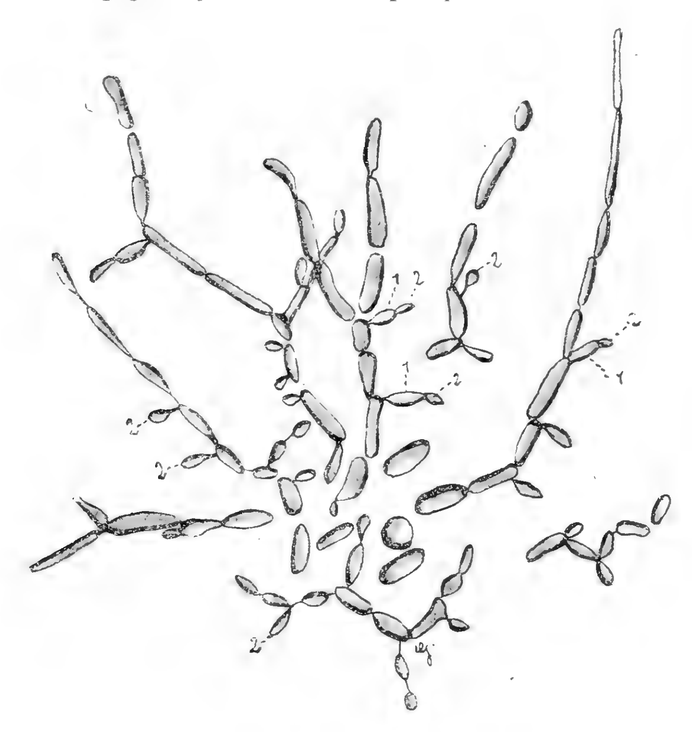


Fig. 3. — *Oospora Perieri* : Culture âgée de 48 heures sur lame en boîte Borrel.

Forme Bouture : fructification en cyme : 1, 1, Conidiophores ; 2, Conidies. — Gross. : 1.323.

M. le Dr Pinoy pense plutôt que ce champignon se rapproche du groupe des *Monilia*. L'absence d'éléments de disjonction ne serait pas un obstacle à cette classification, et ce champignon serait une forme *Monilia*, plus ou moins différenciée, sans disjoncteur.

Pour M. le professeur Matruchot, il s'agit d'un *Oospora* : la disposition en cyme des chapelets conidiens, non ramifiés,

nous paraît être un caractère fondamental de cette espèce fongique; ce qui la différencie de tous les *Oospora* ou *Monilia* dont on pourrait être tenté de le rapprocher.

Cultures.

L'*O. Perieri* pousse abondamment sur tous les milieux solides ou liquides, à la température ordinaire.

1° *Milieux solides.* — Les cultures sont très abondantes sur carotte, betterave, pomme de terre et sur la gélose de Sabouraud. Elles se teintent légèrement, suivant la couleur du milieu sur lequel elles se développent. Le plus souvent, les cultures sont sèches. Cependant, sur certaines carottes, les cultures prennent un aspect légèrement cireux et même déliquescent. Mais ce caractère relativement rare paraît dû plutôt à la qualité du milieu.

Sur grains de blé et sérum coagulé, les cultures sont plus rares. La gélatine est un excellent milieu, mais n'est pas liquéfiée.

2° *Milieux liquides.* — Le liquide de Raulin, les bouillons de viande ou de légumes, le lait constituent d'excellents milieux de culture. L'O. se développe, soit en surface, donnant une pellicule blanchâtre de levures (fig. 3), soit en profondeur, et revêtant alors la forme mycélienne (fig. 5).

Enfin, les milieux alcalins ou neutres paraissent plus favorables que les milieux acides.

Propriétés biologiques.

Toutes ces cultures s'obtiennent, à la température optima de 15° à 18°, en quarante-huit heures. Cependant, à 37°, elles se développent très bien en trois à quatre jours.

L'*O. Perieri* paraît être très sensible aux variations de température, puisque des cultures laissées pendant une heure au bain-marie à une température de 50° et de 80° ne se développent pas.

Chauffé à 45°, il donne des cultures pauvres, plus lentes à se développer.

De même, une culture laissée une heure au bain-marie, dans la glace fondante, donne des éléments pauvres, rabougris, de

véritables *formes de dégénérescence*, dont les éléments contiennent des inclusions rouge foncé sur les lames colorées au bleu lactique.

Ce champignon ne saurait non plus résister à l'action des *antiseptiques* usuels. A des taux très minimes, le nitrate d'argent, la teinture d'iode, la solution de Gram, le formol, le

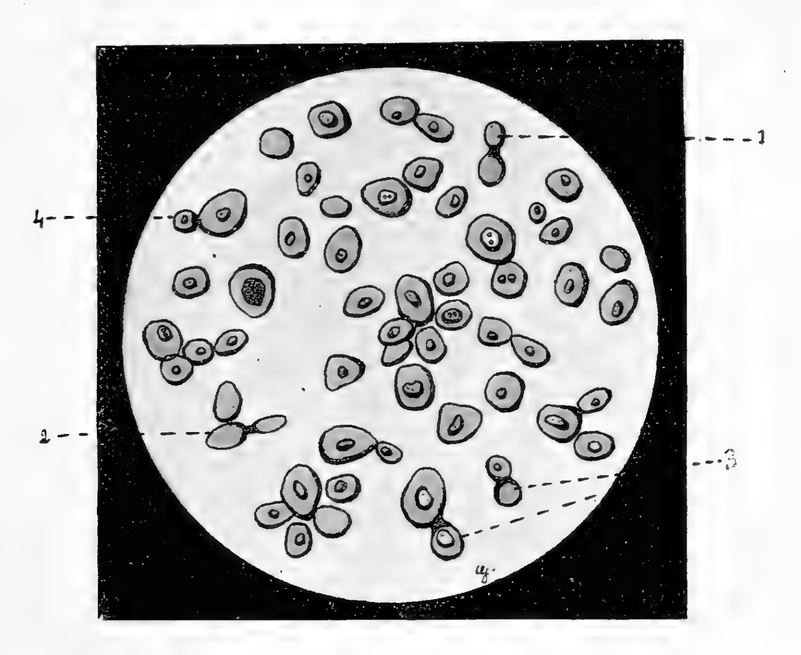


Fig. 4. — *Oospora Perieri* : Culture en goutte pendante.

Forme Levure pure : 1-2-3, en voie de scissiparité; 4, Levure bourgeonnante. — Gross. : 1.323.

sulfate de cuivre, l'électrargol empêchent le développement des cultures.

Au contraire, les milieux *riches en oxygène* favorisent son développement. C'est ainsi que le permanganate de potasse n'entrave en rien le développement des cultures. De même, les bouillons additionnés d'eau oxygénée donnent des cultures très riches : les éléments mycéliens prennent même un développement anormal et la dimension des filaments et des spores devient deux fois plus grande. Ce sont comme des *formes géantes*.

Action pathogène expérimentale.

Des inoculations ont été faites sur le cobaye et sur le lapin.

Des cultures diverses ont été injectées dans la paroi abdominale de cobayes. Il s'est toujours développé, à la suite, un petit abcès *intramusculaire*, avec parfois réaction des lymphatiques et des ganglions voisins, mais sans généralisation. L'amaigrissement de l'animal est toujours manifeste et rapide.

L'examen du pus montre toujours les mêmes caractères, quelle que soit la forme de l'*Oospora* inoculé (levure, bouture ou mycélienne). Les frottis montrent, au milieu des polynucléaires plus ou moins abîmés, des amas nombreux de levures typiques, souvent en voie de scissiparité (fig. 6). L'ensemencement de ce pus à levure sur les divers milieux donne à nouveau des cultures typiques « bouture » ou « mycélienne ».

De même, sur un lapin, nous avons inclus dans la masse des muscles spinaux une écharde de bois et des grains de blé stérilisés, puis ensemencés d'*Oospora*. Il s'est très vite développé un gros abcès, dont le pus a présenté les mêmes éléments caractéristiques que précédemment sur le cobaye.

L'inoculation *intraveineuse* a amené la mort de l'animal en trois jours, avec grosse hémorragie broncho-pulmonaire, sans lésion viscérale.

Enfin l'inoculation *intrapéritonéale* d'une culture polymorphe à un cobaye a provoqué un amaigrissement de 250 grammes, en quinze jours. A l'autopsie, on trouve de multiples petits abcès, disséminés dans le foie, la rate, le grand épiploon, le mésentère, les vésicules séminales. Tous ces abcès contiennent du pus, avec de nombreuses levures en voie de développement. Les ensemencements ont tous été positifs.

En outre, l'examen histologique d'un de ces noyaux infectieux a montré (fig. 6) :

1° Une poche de pus constitué par des polynucléaires, la plupart très abîmés, et par des amas de levures. On ne voit nulle part d'éléments mycéliens.

2° Tout autour de l'abcès, dans le tissu conjonctif interfasciculaire, il y a une prolifération abondante des éléments fixes du tissu conjonctif, infiltration de polynucléaires et néo-

formation capillaire. En outre réaction de périphlébite inflammatoire commune.

Ces divers faits d'expérimentation semblent bien montrer l'action pathogène ou tout au moins toxique des cultures de

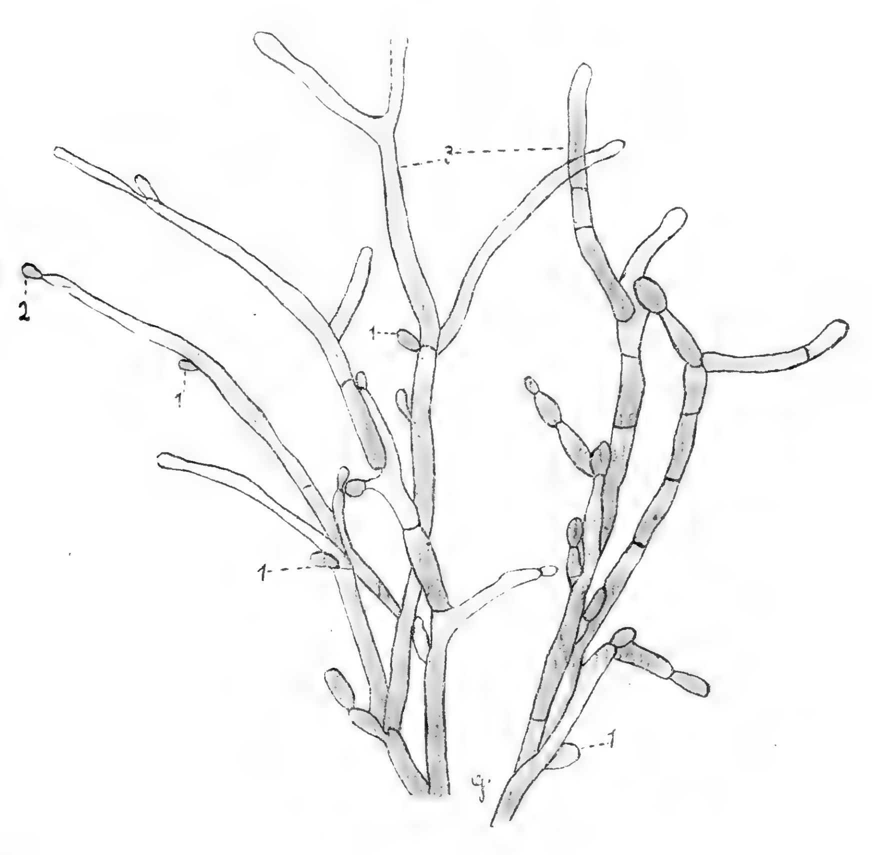


Fig. 5. — *Oospora Perieri* : Culture sur lame en boîte Borrel.

Forme Mycélienne : 1. 1. 1, Spores latérales ; 2, Spore terminale ; 3, Longs éléments mycéliens cloisonnés. — Gross. : 1.323.

l'*Oospora Perieri*. Il est vrai que les liquides irritants pour l'organisme peuvent provoquer des abcès, parce qu'ils tuent les cellules chimiquement, mais les injections intramusculaires d'eau, de sérum, de bouillon ou d'encre de Chine, ne provoquent jamais d'abcès. De même, les inclusions de corps étrangers stérilisés. On voit tous les jours des plaques de

Lambotte, ou des éclats d'obus qui sont parfaitement tolérés dans l'organisme, sans provoquer la formation de la moindre goutte de pus. Et notre expérience sur le lapin, avec les échardes de bois, paraît bien réaliser les conditions d'une blessure avec corps étranger.

D'autre part, il est intéressant de noter que les cultures injectées se transforment après inoculation. Nous avons toujours trouvé le pus contenant des levures, et souvent celles-ci en voie de reproduction. Les formes « bouture » et « mycélienne » ne paraissent pas pouvoir se développer dans l'organisme; elles disparaissent. Seule la forme « levure » paraît donc constituer la *forme pathogène*, sous laquelle l'*Oospora Perieri* peut vivre sur l'homme ou sur l'animal. Par sa présence, ou par la sécrétion de produits toxiques, il produit un afflux leucocytaire intense, et peut même passer dans la circulation soit veineuse, soit lymphatique, comme dans le cas de l'inoculation intrapéritonéale du cobaye, et donner alors des abcès secondaires dans tous les viscères tributaires de la veine porte. Le parasitisme serait donc comme un accident dans l'existence de ce champignon.

Des essais ont été aussi tentés sur la recherche de *précipitine* et d'*agglutinine*, dans le sang des animaux inoculés, mais les résultats obtenus ne permettent pas de se faire une idée absolue sur la question.

Conclusions.

1° L'examen des divers faits que nous avons observés montre bien la diversité de formes que peut revêtir l'*Oospora Perieri* et les passages en série d'une forme dans l'autre (levure, bouture ou mycélienne), suivant les milieux et suivant les conditions extérieures. Il constitue un bel exemple de *pléomorphisme*. D'autre part, chaque forme a ses caractères bien différenciés, son mode de reproduction, son genre de vie, suivant qu'il puise l'oxygène qui lui est nécessaire dans l'air ambiant ou dans les milieux chimiques où on l'ensemence.

L'oxygène paraît devoir jouer un grand rôle dans le développement de ce champignon, puisque les milieux additionnés de permanganate de potasse ou d'eau oxygénée donnent des cul-

tures très riches, et dont les éléments, presque doublés de volume, réalisent de véritables formes géantes. On voit quelle importance cela peut avoir au point de vue thérapeutique, ces deux antiseptiques étant employés communément.

Au contraire, les conditions défavorables, froid et chaleur

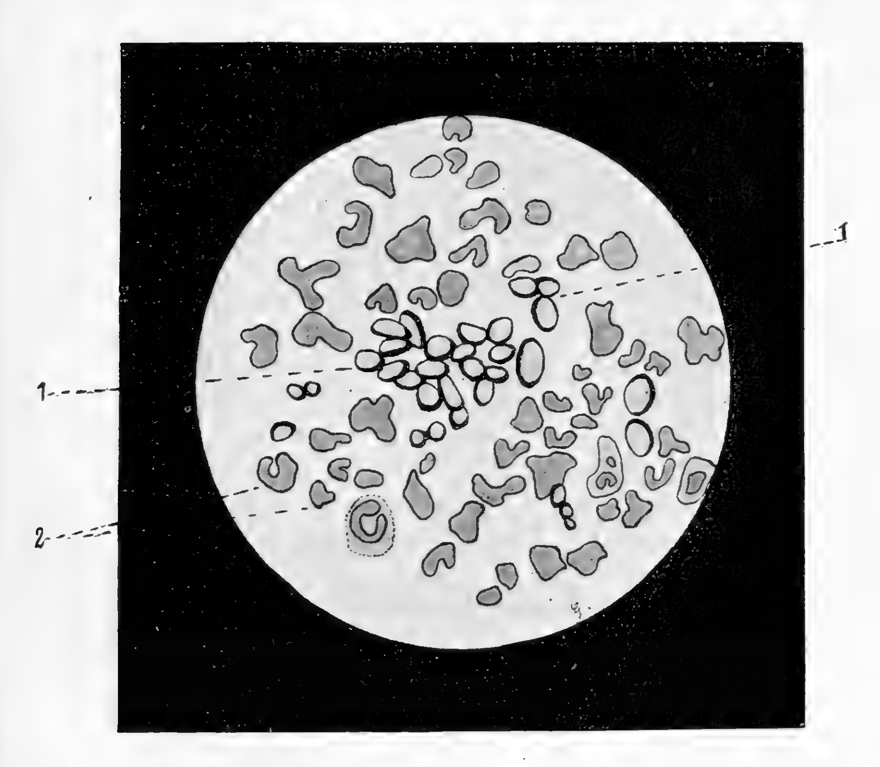


Fig. 6. — Abcès provoqué sur un Cobaye par inoculation intrapéritonéale. Coupe anatomo-pathologique au niveau même de l'abcès de la vésicule séminale. — 1, Amas de levures; 2, Polynucléaires. — Gross. : 1.323.

exagérés, antiseptiques divers, arrêtent le développement du champignon ou donnent parfois des formes larvées, rabougries, ne donnant presque aucune réaction par inoculation au cobaye.

2° L'examen du cas observé chez l'homme et des expérimentations faites, tant sur le cobaye que sur le lapin, montrent que l'*Oospora Perieri* revêt toujours dans les lésions pathologiques la forme levure, quelle que soit la forme inoculée (levure, bouture ou mycélienne). Il semble bien que ce soit sous ce mode

de levure que l'*Oospora* peut vivre seulement dans l'organisme et provoquer alors des lésions pathologiques.

3° Tous les faits d'expérimentation sur le cobaye et sur le lapin, que nous avons rapportés et discutés plus haut, nous permettent d'affirmer que l'*Oospora Perieri* est réellement pathogène. Dans l'observation qui a servi de point de départ à cette étude, il s'agissait d'une infection secondaire de la plaie, soit par les poussières de l'air, soit par un contact septique.

D'ailleurs les cas d'infection de plaies de guerre par champignons ne sont pas rares, quoiqu'on ne s'en soit pas beaucoup occupé. Sans prétendre être complet (la bibliographie nous faisant défaut), nous rappellerons que dans ce journal même, dans le numéro de novembre 1915, MM. Rouyer et Pellissier ont publié plusieurs cas d'infection de plaies par diverses mycoses.

C'est encore à l'action de champignons que MM. Raymond et Parisot ont rattaché de nombreux cas de « pieds des tranchées ».

Enfin M. Tuffier a bien voulu présenter en notre nom à la Société de Chirurgie, le 13 juin 1917, un mémoire sur l'infection des plaies de guerre (primitivement et secondairement) par plusieurs espèces de mycoses. Ces champignons vivent autour de nous et beaucoup peuvent devenir pathogènes, dans certaines conditions, au même titre, par exemple, que le bacille tétanique que l'on retrouve partout dans la terre, ou de multiples autres anaérobies qui pullulent dans les détritus et les déjections. Dans beaucoup de plaies, lentes à guérir, il faut savoir les rechercher par les examens bactériologiques et par les ensemencements appropriés, pour pouvoir instituer un traitement curatif avec les antiseptiques de choix.

CULTURE EN SÉRIE ET ÉVOLUTION CHEZ LE CHEVAL DU PARASITE DE LA LYMPHANGITE ÉPIZOOTIQUE

par L. NÈGRE et A. BOQUET.

La lymphangite épizootique ou farcin d'Afrique est une affection contagieuse des chevaux, qui sévit à l'état endémique dans l'Afrique du Nord. Elle apparaît surtout en hiver pendant la saison pluvieuse et s'observe en Algérie presque exclusivement dans la région du littoral. Depuis le début de la guerre, cette affection a été propagée dans la métropole par les chevaux africains qui y furent envoyés (1).

Cette maladie est déterminée par un parasite spécifique, le *Cryptococcus farciminosus*, découvert par Rivolta, qui l'avait classé dans les champignons blastomycètes par ses caractères morphologiques, mais n'avait pas réussi à le cultiver.

De nombreux auteurs ont essayé de réaliser cette culture. La plupart d'entre eux ont eu des résultats négatifs ou n'ont cultivé que des levures banales. Ainsi Claudio Fermi et Aruch disent avoir obtenu sur pomme de terre le développement du parasite sous la forme blastomycétienne. San Felice dit avoir reproduit la maladie par des cultures du 4e passage.

Marcone et Tokishige ont été les premiers à obtenir le développement du cryptocoque sous la forme mycélienne, mais il paraît ressortir de leurs travaux que, s'ils ont réalisé la première transformation du cryptocoque, ils ne l'ont pas cultivé en série. Tokishige, avec le parasite de la lymphangite épizootique qui sévit au Japon, a cependant obtenu sur les milieux les plus divers la formation de colonies visibles. Mais il ne décrit pas les tubes mycéliens qui dans les repiquages forment les jeunes colonies. Par inoculation sous-cutanée de ses cul-

(1) Pour la description clinique de la maladie, voir J. Bridré, L. Nègre et G. Trouette, *Annales de l'Institut Pasteur*, septembre 1912, n° 7, p. 701.

tures au cheval, il n'a eu qu'une fois la formation d'un abcès à cryptocoques. Il semble donc bien qu'il n'a obtenu qu'un développement incomplet du champignon.

Les résultats de ces derniers auteurs, insuffisamment connus ou non confirmés, ne s'étaient pas imposés puisque dans ces dernières années Gasperini, Ducloux, Mori, Thiroux et Teppaz ont voulu faire du parasite de la lymphangite épizootique un protozoaire.

L'un de nous, en collaboration avec Bridré, a pu montrer que dans la déviation du complément le cryptocoque se comportait, non comme un protozoaire, mais comme une levure, et qu'il devait être considéré comme un blastomycète.

Nous apportons dans ce travail la preuve de la nature mycosique du cryptocoque par la réalisation de sa culture en série et par la reproduction expérimentale de la maladie chez le cheval après inoculation de ces cultures.

PREMIERS ESSAIS DE CULTURE
DÉVELOPPEMENT DU CRYPTOCOQUE SOUS LA FORME MYCÉLIENNE

Nos premières observations ont porté sur du pus contenant des cryptocoques, déposé en couche épaisse sur un milieu gélosé et conservé 8 jours à l'étuve à 24°, puis 2 mois à la température du laboratoire.

Dans ces conditions, nous avons observé les transformations suivantes de certains cryptocoques : Ils augmentent de volume jusqu'à atteindre des dimensions doubles de leurs dimensions primitives et se chargent de gouttelettes réfringentes et de fines granulations. A leur extrémité effilée, il se forme un prolongement cylindrique du diamètre de 2 μ. Ces prolongements, dont le protoplasma est granuleux, s'accroissent dans le sens de la longueur, tout en conservant le même diamètre. Lorsqu'ils atteignent 8 à 9 μ, ils se séparent de la cellule mère par une fine cloison transversale. Il peut se former ainsi un second segment égal au premier. Dans l'eau de condensation des milieux les plus divers, nous avons observé aussi la formation des grosses formes rondes à gouttes réfringentes aux dépens des cryptocoques.

A la suite de ces premiers résultats, nous avons poursuivi

des essais de culture en ensemençant le pus farcineux dans l'eau de condensation d'un grand nombre de divers milieux. Les plus favorables étaient le sérum de cheval ou de mouton coagulé glycériné à 6 p. 100, la gélose au sérum de cheval, la gélose peptonée ordinaire ou la gélose au haricot glucosée à 2 p. 100, non neutralisés.

L'eau de condensation de ces milieux était additionnée de XX gouttes de bouillon de haricots non neutralisé, contenant 2 p. 100 d'un des sucres suivants : glucose, lactose, saccharose.

Nous avons dans ces conditions obtenu une évolution plus complète du cryptocoque. Les bourgeons, issus des grosses formes arrondies des cryptocoques, augmentent de longueur et forment une série d'articles cloisonnés sur lesquels s'insèrent des hyphes secondaires également cloisonnées. La longueur des segments varie entre 5 et 15 μ, leur largeur entre 2 et 4 μ. Sur les filaments et les hyphes secondaires, on observe des renflements terminaux et intercalaires, sphériques ou ovoïdes, d'un diamètre de 5 à 10 μ. Les tubes mycéliens et ces éléments présentent une double paroi et un protoplasma finement granuleux parsemé de gouttelettes d'huile.

Ces formations mycéliennes, déjà décrites par Marcone et par Tokishige, apparaissent dans les cultures à partir du 4e jour, en moyenne de 7 à 15 jours après l'ensemencement. Nous les avons obtenues jusqu'au 4e passage en repiquant les cultures tous les 15 à 20 jours (I ou II gouttes de l'eau de condensation).

L'examen microscopique, pratiqué tous les 3 ou 4 jours, montre qu'il y a réellement développement de filaments nouveaux et non simple conservation du mycélium primitif.

Mais les tubes mycéliens deviennent de plus en plus rares et cette culture en eau de condensation finit par s'éteindre. Nous n'avons jamais observé dans ces cultures la formation de colonies visibles.

Comme l'a fait remarquer Cazalbou à la suite de la publication de ces résultats, nous étions en présence de formes de souffrance dans un milieu de culture insuffisant. Il nous avait permis d'obtenir le développement du cryptocoque sous la forme mycélienne. Mais il était impropre à sa végétation normale et à sa culture en série. Il fallait trouver un milieu plus favorable.

RECHERCHE DU MILIEU QUI NOUS A PERMIS D'OBTENIR DES COLONIES VISIBLES ET DES CULTURES EN SÉRIE

Nous avons pensé que le cryptocoque, parasite du cheval, devait végéter dans le fumier. Nous avons donc préparé avec du crottin de cheval un milieu dont la composition est la suivante :

Faire macérer à froid pendant 24 heures 400 grammes de crottin de cheval, bien sec, dans 2 litres d'eau ordinaire.

Filtrer sur tarlatane, exprimer et filtrer sur papier sans neutraliser. Ajouter 10 grammes de peptone et faire dissoudre 18 grammes de gélose pour 1.000 cent. cubes du liquide précédent. Stériliser 30 minutes à 120°. Filtrer. Ajouter 40 grammes pour 1.000 de glucose, répartir et stériliser 20 minutes à 115°.

Nous avons obtenu le développement des cryptocoques à la surface de ce milieu, en ensemençant par étalement une grosse goutte de pus, prélevée aseptiquement dans un abcès clos des cordons lymphatiques.

En 48 heures, les grosses formes rondes apparaissent, se chargent de gouttes d'huile et émettent des filaments qui se cloisonnent et s'accroissent pour atteindre une longueur totale de 75 à 100 μ.

Bien qu'il n'y eût pas de culture visible, ces résultats réalisaient un progrès important sur nos essais antérieurs : développement en *surface* du parasite, culture plus rapide et beaucoup plus abondante. Mais un très grand nombre d'essais de repiquage de ces cultures sur le même milieu restèrent toujours sans succès.

Le contraste entre le développement presque luxuriant des cryptocoques sur ce nouveau milieu au premier ensemencement et l'absence de toute culture au second repiquage nous a frappés. Nous avons pensé que cette différence pouvait provenir d'un élément qui était introduit en assez grande abondance au premier ensemencement, le pus, et qui n'existait plus au second passage. Nous avions remarqué, en effet, que les filaments se développaient dans le pus déposé sur la paroi des tubes de culture, et qu'à la surface de la gélose au crottin, les points d'élection pour la prolifération des tubes étaient toujours les îlots de leucocytes.

Nous avons cherché à réaliser des conditions analogues en ajoutant aux cryptocoques les éléments nutritifs qui leur étaient apportés par le pus. Ces éléments nous ont été fournis par une macération de ganglions lymphatiques de cheval, préparée de la manière suivante :

Hacher finement 100 grammes de ganglions lymphatiques de cheval. Faire macérer à froid pendant 24 heures dans 500 cent. cubes d'eau ordinaire. Filtrer sur toile et exprimer. Faire dissoudre 20 grammes de glucose. Répartir et stériliser 30 minutes à 115°. Pendant la stérilisation, le liquide s'éclaircit et un dépôt abondant se forme dans les tubes.

20 gouttes de ce dépôt sont répandues à la surface des tubes de gélose déjà ensemencés. Étuve à 25-30°. On maintient l'humidité du milieu en l'humectant avec le liquide de condensation, que l'on remplace par de l'eau de la macération quand il s'est évaporé.

Tel est le milieu sur lequel nous sommes arrivés à réaliser l'apparition de colonies visibles, puis le repiquage des cultures en série.

CARACTÈRES DES CULTURES

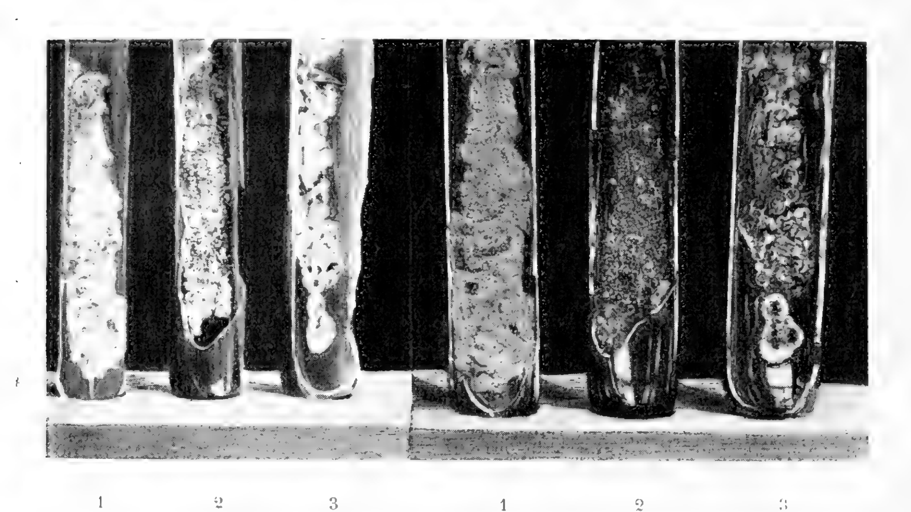
1° *Gélose au crottin.* — 4 à 6 semaines après l'ensemencement du pus, les premières colonies apparaissent à la surface du milieu à 25-30°. Elles se présentent d'abord sous la forme de petites colonies arrondies saillantes, blanc grisâtre, légèrement duveteuses, des dimensions d'une tête d'épingle. Les colonies s'accroissent par la périphérie et en hauteur. Elles deviennent de plus en plus proéminentes et brunissent. Elles prennent un aspect tourmenté et sont parsemées de petits points blancs duveteux. Tout autour de la colonie, à la surface de la gélose, se trouve une aire blanche duveteuse, festonnée.

Les colonies sont dures et compactes. Les éléments qui les composent sont très difficiles à dissocier, elles sont très adhérentes à la gélose. Quand on veut les prélever à l'aide de la spatule de platine, on emporte toujours un morceau de gélose sous-jacente.

Pour faire un réensemencement, il faut prélever une grosse colonie et, après l'avoir introduite dans le tube à ensemencer,

l'écraser entre la spatule et la paroi du tube. Puis on prend avec la spatule les débris obtenus pour les porter à la surface de la gélose qu'on laboure fortement pour y incruster ces parcelles de colonies.

2° *Gélose de Sabouraud.* — Nous avons également pu obtenir sur gélose de Sabouraud recouverte de macération de ganglions le premier développement du cryptocoque sous forme de colonies visibles. A 25-30°, l'incubation des colonies est la même.



1 2 3 1 2 3

Fig. 1.

1. Culture sur gélose de Sabouraud, à 37°;
2. Culture sur gélose au crottin, à 22°;
3. Culture sur gélose de Sabouraud, à 22°.

Le 1er groupe vu légèrement de profil.
Le 2e groupe, vu de face.

Sur ce milieu, les colonies toutes jeunes ont les caractères décrits précédemment. Mais en se développant elles prennent un aspect légèrement différent. Elles sont plus plissées et plus claires. Elles ont une teinte blanc jaunâtre, sablonneuse, et sont entourées d'une zone duveteuse blanche. Elles peuvent être parsemées de petits points blancs; elles deviennent plus foncées en vieillissant. Elles sont, comme sur gélose au crottin, très adhérentes au milieu et très difficiles à dissocier.

Cultures en série. — Nous avons réalisé le premier repiquage sur les mêmes milieux. Mais au repiquage suivant nous avons essayé de supprimer la macération de ganglions, et nous avons obtenu les mêmes résultats avec ou sans addition de ganglions

Au fur et à mesure des passages sur ces milieux, le temps d'incubation des colonies à 25-30° devient plus court. Dans les tout premiers repiquages, il est d'un mois. Au 5e passage, les petites colonies ont apparu au bout de 3 semaines, au 10e passage en 10 jours.

L'aspect des colonies se transforme aussi légèrement tout en conservant les mêmes caractères, elles tendent à devenir plus blanchâtres et duveteuses.

Entre les 5e et 10e passages, nous avons essayé des repiquages sur les divers milieux de laboratoire. Nous avons obtenu à 37° des cultures sur gélose ordinaire, sur gélose glucosée, sur gélose touraillon. Elles ont sur ces milieux le même aspect que sur gélose de Sabouraud, quoique moins duveteuses. Mais leur développement y est beaucoup moins abondant. Sur gélatine, il donne des colonies blanches duveteuses qui la liquéfient assez rapidement.

Nous avons obtenu à 24° le développement des cultures de cryptocoque par repiquage dans les milieux liquides suivants : bouillon de viande glucosé et non glucosé, bouillon au crottin de cheval glucosé, et lait.

Nous avons ensemencé dans ces milieux une grosse colonie prise sur gélose de Sabouraud. Le développement du champignon est plus lent que sur milieu solide.

En bouillon de viande glucosé et non glucosé, la colonie ensemencée a surnagé à la surface et a très lentement augmenté de volume. Au bout de 3 mois, elle a fini par atteindre le diamètre du tube, formant une grosse masse spongieuse à surface tourmentée recouverte d'une partie plus claire et plus transparente. Elle est constituée par des filaments à paroi mince, donnant de rares spores externes par bourgeonnement. Dans le fond du tube, se trouvent quelques flocons constitués par les mêmes éléments.

En bouillon au crottin de cheval glucosé, le champignon pousse sous forme de flocons au fond du tube, agglomérats de

filaments à paroi mince et de spores externes avec nombreuses gouttes d'huile.

En lait, la culture s'est développée très tardivement au bout de 2 mois et demi. Elle n'est pas décelable à l'œil nu; le lait s'est coagulé. Dans le coagulum, on voit au microscope une très grande quantité de formes rondes ayant les dimensions des spores externes, mais à aspect hyalin ne contenant pas de gouttes d'huile.

Nous avons aussi réalisé des repiquages sur pomme de terre et sur carotte. Sur ces deux milieux, la culture est proéminente, légèrement plissée et a un aspect gris brunâtre qui fonce en vieillissant.

Nous sommes actuellement arrivés au 12e passage.

Température de cultures. — Pour le premier ensemencement, la température de choix est celle de 25-30°. A cause de la longue incubation des premières colonies, nous avons toujours obtenu à 37° une dessiccation trop rapide des tubes qui a dû entraver le succès de nos ensemencements.

Mais dans les repiquages ultérieurs, la température de 37° se montre beaucoup plus favorable aux cultures que les températures inférieures.

La croissance du champignon est plus rapide à cette température et son développement beaucoup plus abondant. Ainsi, au 12e passage, nos cultures atteignent à 37°, en 8 à 10 jours, leur plein développement, alors qu'à 25° il leur faut 15 jours à 3 semaines. A 25-28°, les colonies qui se développent sont plus ou moins abondantes. A 37°, le champignon forme un gâteau continu à la surface de la gélose.

A 37°, les colonies ont une consistance tout à fait différente de celle qu'elles acquièrent à 25-28°. Elles ne sont plus adhérentes au milieu, elles sont molles et se laissent très facilement écraser par la spatule. A cette température, leur repiquage est donc beaucoup plus facile.

Enfin, à 37°, les colonies se distinguent aussi par leur aspect de celles qui ont poussé à 25-30°. Ces dernières ont un aspect duveteux beaucoup plus prononcé.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES

Nous avons vu, en exposant les résultats de nos premiers essais de culture, comment le cryptocoque évoluait vers la forme mycélienne. Il s'arrondit, se charge de gouttes d'huile et donne par bourgeonnement des tubes mycéliens cloisonnés, à double contour.

Aux extrémités et sur les ramifications de ces tubes, se forment par bourgeonnement des formes rondes chargées de gouttes d'huile, semblables aux grosses formes rondes des cryptocoques qui leur ont donné naissance. Elles se séparent par une cloison et un étranglement du filament qui les porte et deviennent libres dans le milieu.

Elles bourgeonnent à leur tour en donnant des formations identiques.

Ce sont ces éléments, tubes mycéliens et formes rondes, qui composent les colonies du premier ensemencement.

Voyons maintenant les étapes franchies par le champignon dans les repiquages suivants.

1° Tubes mycéliens a paroi mince. — Les jeunes colonies à aspect duveteux sont formées par des tubes mycéliens à paroi mince. Ces tubes sont très étroits. Ils ont une épaisseur de 2 μ. Ils sont cloisonnés. Les cloisons sont très fines et très peu apparentes. Elles déterminent des segments de longueur irrégulière de 10 à 20 μ environ. Le protoplasma est finement granuleux. Il ne contient pas de gouttes d'huile.

Ces tubes mycéliens donnent des ramifications latérales qui se détachent du filament principal d'une façon assez régulièrement alterne. Sur les ramifications secondaires prennent naissance des ramifications tertiaires. Les ramifications secondaires et tertiaires ont la même épaisseur que le tube principal.

2° Bourgeonnements. — Aux extrémités de tous ces filaments se forment de petits bourgeons en forme de poire. Ils n'ont d'abord qu'une paroi mince, identique à celle des tubes, qui leur ont donné naissance. Puis cette membrane interne

s'épaissit, devient réfringente et prend un double contour. En même temps à la base des bourgeons apparaît une cloison à double épaisseur. Elle se forme dans le prolongement de leur enveloppe externe et les sépare du tube mycélien qui les porte.

On voit apparaître dans leur contenu, au sein du protoplasma à fines granulations, des gouttelettes d'huile qui sont en général agglomérées dans la partie centrale de la cellule. A mesure que les dimensions de la cellule s'accroissent, ces gouttelettes se fusionnent et forment des gouttes d'huile de plus en plus volumineuses.

EXPLICATION DE LA FIGURE 2.

1. C, cryptocoques dans un leucocyte; R, forme arrondie de cryptocoque; T, tube mycélien à double contour provenant du bourgeonnement d'une forme arrondie de cryptocoque encore incluse dans le leucocyte.
2. Tubes mycéliens à paroi mince dans une jeune colonie donnant par bourgeonnement des spores externes à différents stades et un tube mycélien à double contour (T) portant lui-même une spore externe (S).
3. Tube mycélien à paroi mince dans une jeune colonie donnant un tube mycélien à double contour (T) et premier stade du bourgeonnement d'une spore externe à l'extrémité d'une autre ramification (S).
4. Spore externe libre chargée de gouttes d'huile.
5, 6, 7, 8, 9 et 10. Formations mycéliennes à double contour provenant du bourgeonnement des spores externes.
11. Tubes mycéliens à double contour reproduisant des spores externes par bourgeonnement.
12. Chlamydospore libre.
13 et 14. Chlamydospore sur des formations mycéliennes.
15, 16, 17 et 18. Articles mycéliens désagrégés et tourmentés dans les cultures âgées.

3° SPORES EXTERNES. — Nous appellerons spores externes ces formes rondes à double contour, chargées de gouttes d'huile, qui ont pris naissance par bourgeonnement sur les tubes mycéliens.

Quand ces spores externes sont arrivées à maturité, elles se détachent du filament qui les a formées et deviennent libres. Elles prennent en général une forme arrondie, mais restent parfois légèrement ovoïdes.

Les plus petites ont un diamètre de 4 à 5 μ. Leur diamètre le plus fréquent est de 8 à 12 μ. Certaines atteignent jusqu'à 15 et 16 μ de diamètre.

4° TUBES MYCÉLIENS A DOUBLE CONTOUR. — Les tubes mycé-

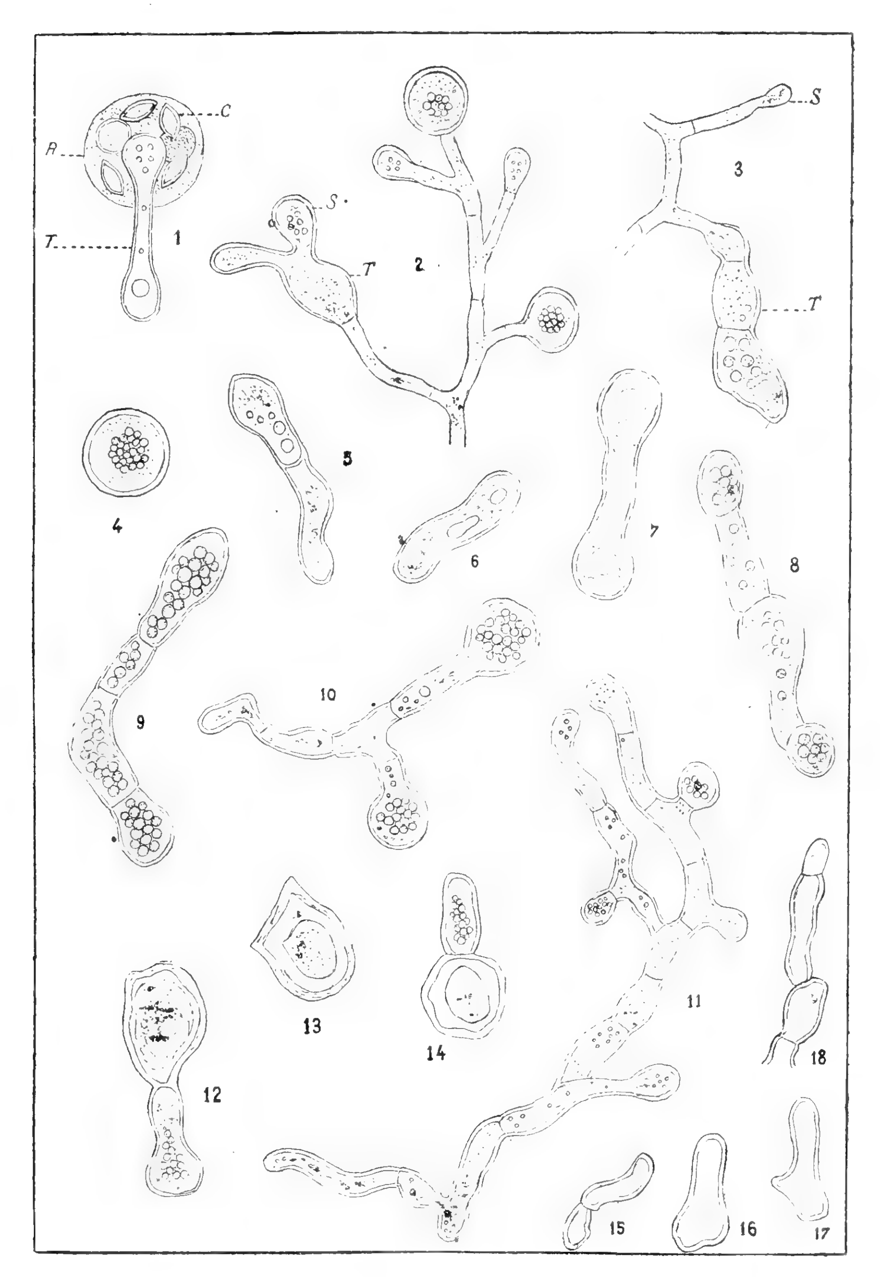


Fig. 2.

liens à double contour prennent naissance par bourgeonnement aux dépens des spores externes. Plus rarement, ils se forment sur les ramifications des tubes mycéliens à paroi mince. Dans ce cas, ces derniers s'élargissent, leur membrane s'épaissit et prend un double contour, leur protoplasma se charge de gouttelettes d'huile.

Les spores externes donnent naissance aux nouvelles formations mycéliennes à double contour de différentes façons.

Certaines s'étirent en donnant un gros tube qui s'allonge par plusieurs segments du même diamètre placés bout à bout. D'autres forment après étirement deux renflements en haltère. Mais le plus grand nombre donnent par bourgeonnement des tubes mycéliens, d'une épaisseur de 3 à 4 μ. Ces tubes mycéliens se ramifient en filaments secondaires et tertiaires de la même épaisseur. Ils sont segmentés en articles de 10 à 18 μ par de fines cloisons transversales. Aux extrémités de tous ces filaments, de nouvelles spores externes prennent naissance par bourgeonnement. Elles sont semblables à celles qui ont formé ces tubes mycéliens.

Tous ces éléments mycéliens sont caractérisés par leur protoplasma à fines granulations, chargé d'une très grosse quantité de gouttes d'huile et par leur double contour. Ils sont identiques aux formations qui proviennent directement du bourgeonnement des formes arrondies des cryptocoques.

Aucun caractère morphologique ne distingue non plus du reste les spores externes des formes arrondies des cryptocoques. Le cryptocoque paraît donc être une forme de multiplication de la spore externe dans l'organisme du cheval.

5° Chlamydospores. — Les chlamydospores se forment sur les tubes mycéliens à double contour. Elles prennent naissance le plus souvent aux extrémités des tubes trapus et courts, formés d'un petit nombre de segments. Dans les cultures en souffrance, nous les avons vues se former aussi intercalairement entre les segments mycéliens.

Elles sont légèrement polygonales, à double contour très épais. Leurs dimensions varient de 10 à 18 μ. Leur protoplasma finement granuleux, sans gouttes d'huile, est condensé au centre de la cellule.

6° Vieilles cultures. — Dans les vieilles cultures, le mycélium prend un aspect absolument différent de celui que nous venons de décrire.

Tous les articles des tubes mycéliens se désagrègent et s'isolent. Les fines granulations et les gouttes d'huile du protoplasma disparaissent. La cellule paraît vide de son contenu. La membrane externe est épaisse et réfringente. Les deux contours ne sont plus rigoureusement parallèles. La forme générale de la cellule est tourmentée. Il s'agit là probablement de formes de repos et de résistance, car à ce stade les cultures se laissent difficilement repiquer.

7° Ascospores. — Dans nos premiers essais, nous avons rencontré dans des cultures en souffrance des cellules à double paroi contenant trois ou quatre éléments identiques aux cryptocoques du pus. Nous n'avons aperçu qu'à deux reprises une ou deux de ces formations. Il nous a été donc impossible de les identifier par les méthodes de coloration habituelles, mais morphologiquement, elles nous ont fait penser à des ascospores.

Nous ne les avons plus jamais retrouvées. Pinoy n'est pas arrivé à en reproduire la formation.

Tout en faisant toutes réserves sur cette constatation, nous tenons à la mentionner à cause de son importance. Si elle était confirmée, elle permettrait de classer le champignon de la lymphangite épizootique dans le genre Endomyces.

Tokishige a décrit comme ascospores les gouttes d'huile qui prennent naissance dans les tubes mycéliens à double contour et dans les spores externes.

L'évolution de ces corpuscules dont nous avons parlé pouvait déjà leur faire accorder une signification toute différente. Pour préciser leur nature, nous avons traité les cellules qui les contenaient par une solution d'acide osmique à 1 p. 100. Sous son action, les gouttelettes ont pris une teinte brune qui nous fait admettre, comme l'avait pensé Guilliermond, que ces formations ne sont pas des ascospores, mais des gouttes d'huile. Elles paraissent être des réserves nutritives qui s'emmagasinent dans les formes de bourgeonnement. Elles disparaissent dans les chlamydospores et dans les formes de repos dans les vieilles cultures.

8° Coloration. — Toutes les formations à double contour sont comme les cryptocoques rebelles aux colorants ordinaires des champignons.

Seuls les filaments mycéliens à une seule paroi qui se développent au début des cultures en séries se colorent par la thionine ou le bleu au lactophénol, mais ils prennent mal le colorant. La partie centrale du tube seule est bien colorée.

9° Evolution du cryptocoque. — En résumé, l'évolution du cryptocoque dans les cultures peut se schématiser de la façon suivante :

Premier ensemencement.	Repiquages.
—	—
Cryptocoque s'accroît, s'arrondit et donne	Tube mycélien à paroi mince donnant par bourgeonnement
↓	
Grosses formes rondes chargées de gouttes d'huile, donnent par bourgeonnement	Grosses formes rondes chargées de gouttes d'huile donnent par bourgeonnement
	
Tubes mycéliens à double paroi portant spores externes et chlamydospores. Les spores externes reproduisent par bourgeonnement les mêmes formations	Tubes mycéliens à double paroi portant spores externes et chlamydospores. Les spores externes reproduisent par bourgeonnement les mêmes formations
	
Dans les vieilles cultures évoluant en éléments désagrégés à contour tourmenté.	Dans les vieilles cultures évoluant en éléments désagrégés à contour tourmenté.

10° Évolution des colonies. — Les colonies présentent l'évolution suivante au cours de leur développement.

A. — *Jeunes colonies*. Elles sont d'abord formées uniquement de tubes mycéliens fins à paroi mince. Puis les spores externes et les tubes mycéliens à double paroi commencent à apparaître. Les premiers éléments restent prédominants.

B. — *Colonies en plein développement*. Elles se composent presque exclusivement de tubes mycéliens à double contour et de spores externes. On y trouve encore de rares îlots de tubes mycéliens fins à paroi mince. Les chlamydospores sont rares.

C. — *Vieilles colonies*. L'aspect des éléments qui les com-

posent a complètement changé. Par désagrégation de leurs segments, les tubes ont disparu. Les colonies sont formées d'éléments contournés à double paroi épaisse et réfringente et de chlamydospores.

Dans les parties desséchées des tubes, c'est-à-dire dans la partie supérieure des tubes de gélose inclinée, les éléments mycéliens prennent très rapidement ce dernier aspect. L'aspect morphologique du champignon à l'examen microscopique n'est donc pas une base suffisante pour apprécier l'âge d'une colonie.

INOCULATION DES CULTURES AUX ANIMAUX

INOCULATIONS AU CHEVAL

1° *Première série d'expériences sur le cheval Guili. — Inoculations de colonies du 1er passage ensemencées depuis 3 mois, contenant quelques rares cryptocoques qui n'ont pas bourgeonné.*

Exp. A. — *Inoculations par scarification.*

De légères scarifications avec la pointe d'une aiguille sont faites sur une plaque d'épiderme préalablement rasé. La plaie est souillée avec des cultures émulsionnées dans de l'eau physiologique.

2 mois après, de petits boutons lenticulaires apparaissent à la surface de la peau rasée sur une plaque grande comme une pièce de 50 centimes. Le derme au-dessous est rouge et laisse suinter un peu de lymphe claire. Celle-ci, examinée au microscope, montre des cryptocoques en assez petit nombre, libres ou intracellulaires. La région est sensible. Dans les jours suivants, la plaque de boutons s'étend et suppure. Cette suppuration a duré plusieurs mois sans s'étendre.

Exp. B. — *Inoculations intradermiques.*

1/3 de cent. cube d'une colonie broyée et émulsionnée en eau physiologique est inoculé dans le derme du boulet droit et dans la lèvre.

Léger œdème au point d'inoculation, qui disparaît en 4 ou 5 jours. Grande sensibilité.

48 jours après l'inoculation, de petits nodules apparaissent aux points d'injection, du volume d'un petit pois. Ils restent sensibles à la pression.

Vers le 53e jour, ces boutons s'ulcèrent. Dans le pus, on trouve des cryptocoques typiques.

Les boutons ont suppuré pendant plusieurs mois. Une petite corde, partant du bouton de la lèvre, s'est dessinée, puis a disparu.

1/3 de cent. cube de l'émulsion précédente est inoculé en même temps dans le derme de l'épaule droite. Œdème au point d'inoculation, qui fait place immédiatement à un nodule induré, très sensible au toucher.

3 semaines après l'injection, on prélève par biopsie le nodule. Il est formé d'un tissu fibreux assez dur d'où s'échappe une sérosité sanguinolente contenant des petites formes de la dimension d'un cryptocoque, mais n'ayant qu'une paroi mince.

Dans les jours suivants, la plaie se cicatrise, puis elle s'ouvre en laissant s'écouler du pus contenant des cryptocoques typiques.

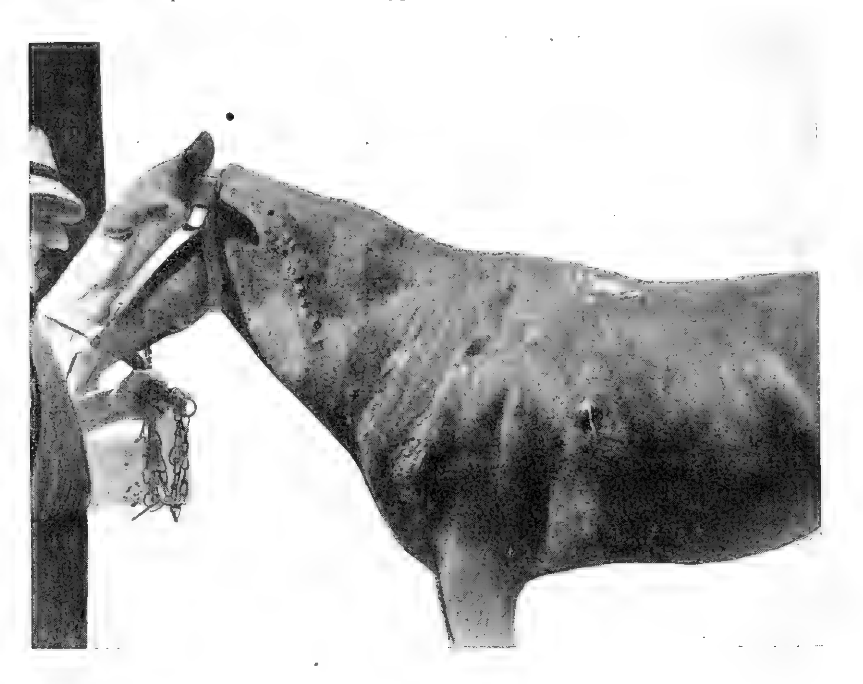


Fig. 3.

Reproduction expérimentale de la lymphangite épizootique chez le cheval Guili. Sur le cou, double cordon en chapelet. A l'épaule, lésions provoquées par scarifications de la peau et badigeonnage de cultures.

Exp. C. — *Inoculation sous-cutanée.*

1/3 de cent. cube de l'émulsion des cultures précédentes est injecté en même temps dans le tissu sous-cutané de la nuque gauche.

Pendant les 3 premiers jours après l'injection, gros œdème très douloureux au moindre toucher. Il diminue progressivement et vers le 25e jour se condense en un nodule gros comme un pois. Ce nodule reste très sensible à la pression. Il semble adhérer au plan profond. Le 31e jour, on prélève par biopsie un fragment de ce nodule, formé par un tissu organisé fibreux dur. Dans la sérosité, on constate au microscope la présence de petites formes

des dimensions du cryptocoque, certaines sans double contour, d'autres avec le double contour caractéristique.

Vers le 50e jour, une deuxième phase de la lésion commence. Elle est caractérisée par l'augmentation de volume du nodule qui atteint les dimensions d'une grosse noix et par l'apparition d'œdèmes : œdème périphérique autour de la lésion, œdème à distance au niveau de la gorge et sur la partie latérale de l'encolure.

Au 60e jour, tous ces œdèmes disparaissent. Le nodule augmente, devient fluctuant et s'ouvre en laissant sourdre un pus à cryptocoques. Une petite corde dure apparaît dans son prolongement. Cette petite corde disparaît au bout de 2 jours, puis réapparaît le 70e jour.

A cette date, du bouton qui suppure partent 2 cordes obliques se dirigeant vers la gouttière jugulaire. La corde inférieure a le volume d'un gros crayon et présente sur son trajet des boutons des dimensions d'une pièce de 50 centimes. La supérieure est plus petite. A leurs extrémités inférieures, elles se rapprochent. Leur longueur atteint environ les 2/3 de la longueur de l'encolure. La corde inférieure présente 11 boutons clos, la corde supérieure 7.

Le 73e jour, la corde supérieure disparaît et ne reste jalonnée que par 2 petits boutons. Il ne subsiste qu'une corde unique en chapelet.

Au bout de 4 mois 1/2, les boutons s'abcèdent. La guérison est survenue en 7 mois.

2° *Deuxième série d'expériences sur le cheval Agreb. — Inoculations des cultures du 8e passage dont la souche a été isolée 11 mois auparavant.*

Exp. D. — *Inoculations intradermiques.*

4 injections de 1 c.c.5 d'émulsions de cultures âgées de 3 semaines sont pratiquées de chaque côté de la nuque et de chaque côté de la partie latérale du cou.

Pendant les 4 premiers jours, gros œdème au point d'injection, très douloureux à la palpation.

Le 5e jour, il se résorbe et fait place à des nodules durs de la dimension d'une noix.

Jusqu'au 10e jour, ces nodules se résorbent et ne présentent plus que le volume d'un pois.

Vers le 20e jour, les deux nodules de droite augmentent subitement de volume. Ils atteignent les dimensions d'un œuf. Le 28e jour, une fluctuation apparaît. Un des abcès est ponctionné et laisse sourdre un pus contenant des cryptocoques typiques, intraleucocytaires. Les deux abcès se mettent à suppurer. Aucun signe de généralisation dans le voisinage.

Les deux nodules de gauche, après avoir augmenté de volume comme les deux précédents, ont régressé vers le 20e jour. Au bout de 1 mois, ils ont de nouveau augmenté, se sont ramollis et se sont mis à suppurer. Tous ces nodules sont toujours restés très sensibles à la pression.

Exp. E. — *Inoculations sous-cutanées.*

Des quantités semblables des cultures précédentes sont injectées sous la peau au niveau des épaules droite et gauche. Pendant les 4 premiers jours, œdème beaucoup plus étendu et volumineux que dans les inoculations précédentes. Très grande sensibilité. Le 5e jour, l'œdème se résorbe et fait place à des nodules durs du volume d'une amande.

Les nodules diminuent jusque vers la fin de la 3e semaine. Puis ils se mettent à augmenter et atteignent au bout de 4 semaines les dimensions d'un gros œuf de poule. Quelques jours après, des cordes filiformes dures apparaissent. Elles partent de ces nodules et descendent en contournant la face externe de l'avant-bras jusqu'à mi-hauteur. Au bout de 2 mois, le nodule de gauche se met à suppurer et se vide peu à peu. Le nodule de droite est resté beaucoup plus longtemps sous la forme d'une grosse masse indurée, qui a fini par se ramollir et a donné issue à un pus contenant des cryptocoques.

Mode d'inoculation expérimentale. — Il ressort de toutes ces expériences que les inoculations par scarification de l'épiderme et que les injections intradermiques ne nous ont donné que des abcès à cryptocoques localisés au point d'inoculation.

Seules, les injections sous-cutanées ont abouti à une généralisation du cryptocoque et nous ont permis de reproduire expérimentalement la maladie, ce qui n'avait pas été réalisé jusqu'à présent avec les formes mycéliennes du cryptocoque.

Inoculations aux petits animaux. — Des émulsions de cultures du 8e passage âgées de 3 semaines ont été inoculées aux petits animaux de laboratoire : lapin, cobaye, souris.

L'inoculation intraveineuse chez le lapin et sous-cutanée chez le cobaye ne nous a donné aucun résultat jusqu'à présent.

Les inoculations sous-cutanées chez le lapin et chez la souris ont abouti, au bout de 5 semaines, à la formation d'un petit abcès au point d'injection. Dans le pus de cet abcès, nous avons trouvé quelques rares cryptocoques à double membrane. Aucun d'eux n'était intraleucocytaire.

Une inoculation sous-cutanée au singe (macaque) est restée sans résultat.

Evolution des lésions expérimentales chez le cheval. — L'inoculation des cultures au cheval, quel que soit le mode employé, est toujours caractérisée par l'apparition d'un gros œdème. Il

se produit dans les 24 heures après l'injection, et disparaît 4 ou 5 jours après. Cet œdème est très sensible à la pression.

Cet œdème fait place à un nodule induré dont les dimensions varient entre celles d'un pois et d'une amande, qui peut disparaître complètement, rester stationnaire ou présenter des alternatives d'extension ou de régression, accompagnées quelquefois d'œdèmes transitoires.

Il est formé par un tissu induré fibreux contenant une sérosité sanguinolente, dans laquelle nous avons pu constater au bout de 4 semaines la présence de cryptocoques.

Ces nodules restent, pendant tout le cours de leur évolution, très sensibles à la palpation.

4 à 8 semaines après l'injection, ces nodules se ramollissent totalement ou partiellement et s'ouvrent à l'extérieur, en laissant s'écouler le pus contenant des leucocytes bourrés de cryptocoques.

Dans le même intervalle de temps, après injection sous-cutanée, les premières manifestations de la généralisation apparaissent sous la forme d'une petite corde dure, filiforme, partant de la lésion primitive. Sur le trajet de cette corde apparaissent ensuite les petits abcès clos qui caractérisent les cordes lymphatiques de la lymphangite épizootique. On a ainsi le tableau complet de la maladie naturelle. En résumé, l'incubation dans la maladie expérimentale est de 4 à 8 semaines.

Évolution chez les petits animaux de laboratoire. — Nous avons pu réaliser chez le lapin et la souris, par inoculations sous-cutanées de cultures, des abcès localisés à cryptocoques, dont la durée d'incubation est la même que chez le cheval.

Ils sont caractérisés par la rareté des cryptocoques et par leur absence de pénétration dans les leucocytes.

ÉVOLUTION DU CHAMPIGNON DANS L'ORGANISME DE L'ANIMAL INOCULÉ

Dans le nodule fibreux induré qui se produit au point d'inoculation des cultures, nous avons pu mettre en évidence, de 3 à 4 semaines après l'injection, de petits corps ovoïdes apiculés, ayant l'aspect morphologique du cryptocoque, mais un

peu plus petits que lui et sans double contour. Ils sont tous libres et se reproduisent par bourgeonnement. Nous avons également vu avec eux, dans la sérosité sanguinolente qui s'écoule du nodule, des formes rondes à double contour, avec ou sans gouttelettes d'huile.

Dans une expérience que nous n'avons pas encore relatée dans ce mémoire, nous avons inoculé à un cheval, par injections sous-cutanée et intradermique, les tubes mycéliens et les formes rondes que nous avons obtenus dans nos premiers essais de culture du cryptocoque dans l'eau de condensation de certains milieux. Cet animal reçut ensuite 1 cent. cube d'une culture dans la veine.

3 semaines après, un œdème apparut sur l'avant-bras, à 15 centimètres environ au-dessous d'un des points de l'inoculation intradermique. Cet œdème persista pendant 6 jours, et après sa disparition on remarqua dans la même région une légère dépilation et un soulèvement épidermique de 6 à 7 millimètres de diamètre.

L'examen microscopique de cet épiderme broyé entre les deux lames de verre décela les éléments suivants, en petit nombre :

1° Des cryptocoques typiques, caractérisés par leurs dimensions de 3 à 4 μ, leur forme en citron, le corpuscule mobile inclus dans leur protoplasma et leur double coque.

2° Des formes arrondies de 5 à 6 μ, réunies en amas de 10 à 15 éléments. Certaines d'entre elles étaient en voie de bourgeonnement.

3° De courts filaments irréguliers à double contour. Dans la suite, cette lésion épidermique se cicatrisa normalement et en aucun point de la surface de la peau nous n'avons pu retrouver les mêmes éléments.

Il n'est pas possible d'établir une relation certaine entre cette observation et les inoculations pratiquées, étant donné que les cryptocoques n'ont pas gagné les tissus profonds. Mais ces faits démontrent que le champignon de la lymphangite peut végéter dans l'épiderme du cheval, sous la forme qui a été obtenue dans les cultures.

Le cryptocoque paraît prendre naissance par bourgeonnement aux dépens des formes rondes. Il se présente d'abord, au bout

de la 3e semaine après l'inoculation, sous la forme de petits éléments ovoïdes à paroi mince. Ces petits éléments sont libres et se reproduisent eux-mêmes par bourgeonnement.

Quand la lésion se ramollit et que le pus fait son apparition, les cryptocoques ont leur aspect caractéristique à double contour et sont tous intraleucocytaires.

Relation entre les leucocytes et la biologie du cryptocoque. — Certains auteurs ont voulu voir dans le cryptocoque un parasite des globules blancs. L'un de nous a montré, avec Bridré et Trouette, que dans les nodosités jeunes se trouvent de véritables colonies de cryptocoques libres. Il est donc certain que le cryptocoque n'est pas un parasite exclusif des leucocytes.

Mais s'il n'est pas un véritable « leucocytozoon », les résultats des cultures semblent montrer que c'est dans le pus et dans les débris des leucocytes qu'il puise les éléments les plus favorables à son développement. Nous rappelons les faits sur lesquels nous avons déjà attiré l'attention : première transformation du cryptocoque dans le pus, nécessité de la présence des corps leucocytaires pour le succès des repiquages.

Nous avons même observé, à plusieurs reprises, le premier développement des cryptocoques à l'intérieur de leucocytes absolument intacts d'apparence. Ils s'arrondissent, se chargent de gouttelettes d'huile, puis certains se mettent à bourgeonner. Le tube mycélien issu de ce bourgeonnement sort dans le milieu extérieur, la forme ronde qui lui a donné naissance restant incluse dans le leucocyte. Il semble donc, dans ce cas, que la phagocytose puisse être suivie d'une véritable symbiose entre le cryptocoque et le leucocyte.

Cette affinité du cryptocoque pour le leucocyte expliquerait ce fait d'observation clinique qu'une plaie préexistante sert toujours de porte d'entrée à la maladie. La forme mycélienne du cryptocoque peut, comme nous l'avons vu, végéter dans l'épiderme du cheval. Une plaie banale créerait à l'extérieur un afflux leucocytaire grâce auquel le cryptocoque se glisserait dans le système lymphatique.

Nous devons noter, en faveur de cette hypothèse, que dans les lésions expérimentales à leur début, la plupart des cryptocoques sont intraleucocytaires.

DÉVIATION DU COMPLÉMENT EN PRÉSENCE DU SÉRUM DES ANIMAUX MALADES ET DES CULTURES DU CRYPTOCOQUE COMME ANTIGÈNE

L'un de nous avait établi, en collaboration avec Bridré, la présence d'une sensibilisatrice dans le sérum des animaux atteints de lymphangite épizootique. Cette sensibilisatrice manifeste son action en présence du parasite (émulsion de cryptocoques du pus dans l'eau physiologique) et en présence de levures.

Il était indiqué de reprendre ces expériences avec un antigène pur, fourni par les cultures. Nous nous sommes servis de colonies finement broyées dans un mortier, le produit du broyage est émulsionné dans l'eau physiologique. Cette émulsion est diluée et titrée pour qu'elle n'empêche pas l'hémolyse. Le sérum des animaux atteints de lymphangite épizootique fixe le complément en présence de la culture du cryptocoque, comme il le fixe en présence des cryptocoques du pus. Cette action se manifeste non seulement en présence de levures, mais de cultures du *Sporotrichum Beurmani*. Il n'y a pas lieu de nous en étonner, puisqu'il a été établi dans d'autres mycoses, comme la sporotrichose, que la réaction de déviation du complément n'est pas rigoureusement spécifique et qu'elle se produit non seulement avec le parasite de la maladie, mais avec des champignons voisins. Nous avons ensuite recherché, avec les cultures comme antigène, l'apparition des anticorps dans le sérum des chevaux malades :

ANTIGÈNE	CHEVAL — Début datant de **10 jours** NON OPÉRÉ	CHEVAL — Début datant de **17 jours** OPÉRÉ	CHEVAL — Début datant de **20 jours** OPÉRÉ	CHEVAL — Début datant de **2 mois 1/2** OPÉRÉ	CHEVAL — Début datant de **4 mois 1/2** OPÉRÉ	CHEVAL — Début datant de **8 mois** OPÉRÉ, GUÉRI
0,1	0	0	0	+	0	+
0,2	0	0	0	+	+	+
0,3	0	0	0	+	+	+
0,4	0	0	0	+	+	+
0,5	0	0	+	+	+	+

Les anticorps peuvent donc être mis en évidence par la réaction de déviation du complément 20 jours environ après le début apparent de la maladie.

Ils paraissent persister pendant une longue période, puisqu'un cheval opéré et guéri d'une maladie dont le début remontait à 8 mois, présente dans son sérum une très grande quantité d'anticorps.

IMMUNITÉ

L'étude clinique de la lymphangite épizootique montre qu'un animal guéri est réfractaire à une nouvelle atteinte de cette maladie.

Nous avons pu établir expérimentalement l'existence de cette immunité.

Exp. I. — Un mois et demi après les injections des expériences A, B et C, de nouvelles injections de cultures sont faites au cheval Guili en trois points différents. Œdème très limité et sensible qui disparaît en 3 ou 4 jours. Il fait place à un nodule du volume d'un pois qui reste stationnaire pendant quelque temps et finit par se résorber.

Quelques jours après, Guili reçoit encore une injection sous-cutanée de 1 c.c. 5 d'émulsion de cultures. Un gros œdème très douloureux se forme. Au bout de quatre jours, l'œdème disparaît et fait place à un noyau de la grosseur d'une noix, fluctuant. Cet abcès s'ouvre et suppure pendant 3 semaines. Ce pus n'a pas donné de culture microbienne et n'a pas présenté de cryptocoques.

Exp. II. — Le même cheval reçoit, un mois après sa guérison complète, deux injections intradermiques et sous-cutanées de cultures qui sont inoculées en même temps au cheval témoin Agreb (exp. D et E).

Le cheval guéri Guili a présenté pendant trois jours des œdèmes aux points d'inoculation. Ces œdèmes ont disparu en laissant place à de petits nodules qui se sont résorbés au bout de trois semaines.

Le cheval témoin Agreb a contracté la lymphangite. Le cheval Guili a donc été réfractaire à de nouvelles injections de cultures un mois et demi après les premières inoculations. Il avait à ce moment des abcès à cryptocoques. A la dernière de ces injections, il semble même avoir présenté des phénomènes d'intolérance pour le champignon, puisque l'inoculation a été immédiatement suivie d'un abcès aseptique.

Mais cette expérience n'est pas complète puisque nous n'avons pas de cheval témoin.

Dans l'expérience II, le cheval guéri Guili a été réfractaire à la lymphangite alors que le cheval témoin Agreb contractait l'infection.

Le résultat de la dernière injection de l'expérience I montre qu'après un certain nombre d'injections de cultures l'organisme du cheval montre de l'intolérance pour le champignon inoculé.

Nous avons pu reproduire à plusieurs reprises ce phénomène chez des chevaux traités à intervalles réguliers avec des cultures chauffées de cryptocoques. Cette intolérance se manifeste après 2 ou 3 injections de cultures et seulement lorsque les doses en sont assez élevées.

L'un de nous, en collaboration avec Bridré et Trouette, avait déjà montré qu'un cheval traité par des injections de levures finissait par présenter une sensibilisation qui lui faisait éliminer de nouvelles levures inoculées. Un abcès se formait au point d'inoculation.

Les résultats obtenus avec les cultures de cryptocoques paraissent tenir aux mêmes causes.

Comme nous en avons eu l'idée pour les levures, nous cherchons à mettre à profit cette intolérance de l'organisme au point de vue de la prophylaxie de la maladie. Dans des écuries contaminées, deux lots de chevaux sont constitués. Un lot est conservé comme témoin. Les chevaux de l'autre lot reçoivent en injection sous-cutanée des cultures chauffées de cryptocoques. L'avenir nous dira ce qu'on peut attendre de cette méthode. Nous essayons aussi de vacciner préventivement les chevaux par inoculation intradermique de cultures vivantes. Il se produit ainsi un abcès à cryptocoques sans généralisation qui, d'après l'expérience I de Guili, immunisera probablement les chevaux contre la maladie naturelle.

L'immunité constatée chez les chevaux en cours de maladie ou guéris nous a orientés vers la recherche d'un traitement de la lymphangite épizootique par des injections de cultures.

Ces expériences sont en cours et feront l'objet d'une publication spéciale.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le pus à cryptocoques, prélevé aseptiquement dans un abcès clos, et ensemencé sur gélose au crottin de cheval recouverte d'une macération de ganglions du même animal, donne des colonies visibles qui sont repiquables sur le même milieu et sur gélose de Sabouraud, avec et puis sans macération de ganglions.

Au fur et à mesure des repiquages, la culture du champignon est plus facile, son développement plus rapide. Après quelques passages il a pu être repiqué sur divers milieux gélosés, sur gélatine, pomme de terre et carotte.

La température de culture la plus favorable est celle de 37°. A cette température les colonies sur gélose de Sabouraud sont d'un jaune sablonneux. Elles sont plissées et parsemées de petits points blancs duveteux.

Aux températures inférieures, elles prennent un aspect duveteux beaucoup plus prononcé.

Au premier ensemencement, le cryptocoque se gonfle, prend une forme arrondie et se charge de gouttes d'huile. Il bourgeonne alors en donnant des tubes mycéliens à double paroi qui émettent des spores externes.

Dans les repiquages suivants, les jeunes colonies sont formées de tubes mycéliens cloisonnés à paroi mince.

Dans les colonies plus âgées, ces filaments disparaissent après avoir donné par bourgeonnement des spores externes. Ces dernières donnent naissance à des tubes mycéliens cloisonnés à double contour portant des spores externes et des chlamydospores ; ils sont identiques à ceux qui proviennent du bourgeonnement des formes arrondies du cryptocoque.

La forme arrondie que le cryptocoque prend dans les cultures au premier ensemencement et la spore externe sont donc le point de départ des mêmes formations mycéliennes. Aucun caractère morphologique ne les distingue.

Il semble donc que le cryptocoque est la forme de multiplication dans l'organisme de la spore externe.

Nous avons constaté que le cryptocoque pouvait végéter dans l'épiderme du cheval sous les formes mycéliennes précédentes :

tubes à double contour et spores externes. D'après une constatation unique que nous avons faite et qui demande à être confirmée, le cryptocoque prend naissance dans l'épiderme du cheval par bourgeonnement de la spore externe. Au moment du bourgeonnement il n'a qu'une paroi mince.

Dans les vieilles cultures, tous les articles des tubes mycéliens se disloquent et prennent un aspect tourmenté.

Les cultures de champignon inoculées au cheval par scarifications épidermiques ou dans le derme donnent des boutons ou des abcès à cryptocoques. Par inoculations sous-cutanées, elles donnent des abcès à cryptocoques, qui peuvent ensuite se généraliser en cordes lymphatiques reproduisant le tableau clinique de la maladie naturelle.

Les cryptocoques apparaissent dans les lésions de 3 à 4 semaines après l'inoculation. Ils sont d'abord libres et se présentent alors sous la forme de petits éléments ovoïdes à paroi mince, puis ils prennent un double contour et deviennent la plupart intraleucocytaires.

Le sérum des animaux malades donne une réaction de fixation positive avec les cultures du champignon. Les anticorps peuvent être mis en évidence dans le sang vers le 20e jour après le début apparent de la maladie. Ils persistent longtemps après la guérison.

Un cheval, guéri d'une première atteinte de lymphangite, est réfractaire à une nouvelle inoculation de cultures.

En résumé, nous avons réussi à obtenir le développement du cryptocoque sous la forme mycélienne, nous avons réalisé la culture en série du champignon, nous avons constaté sa végétation dans l'épiderme du cheval sous le même état que dans les cultures, nous avons reproduit expérimentalement la maladie par inoculation des cultures et constaté l'apparition et l'évolution du cryptocoque dans les lésions provoquées.

Nous pouvons donc conclure que le cryptocoque est la forme de multiplication dans l'organisme du cheval du champignon que nous avons décrit.

Ce champignon ne pourra être classé que lorsque sa reproduction sexuée sera connue d'une façon certaine.

Nous tenons, en terminant, à remercier nos collègues

MM. Ét. Sergent et Musso qui ont bien voulu nous prêter leur concours pour les photographies qui figurent dans ce travail; nous exprimons aussi notre reconnaissance à M. Pinoy pour les conseils qu'il nous a donnés au cours de nos recherches.

BIBLIOGRAPHIE

Bridré, Nègre et Trouette. — Recherches sur la lymphangite épizootique en Algérie. *Ann. Inst. Past.* Sept. 1912, n° 7, p. 707.

A. Boquet et L. Nègre. — Sur la nature mycosique du parasite de la lymphangite épizootique. Formation de gouttelettes d'huile et de filaments. *Bull. Soc. Path. exot.* Séance du 10 juin 1914, n° 6, t. VII.

A. Boquet et L. Nègre. — Sur l'évolution du parasite de la lymphangite épizootique chez le cheval. *Bull. Soc. Path. exot.* Séance du 12 mai 1915, n° 5, t. VIII.

A. Boquet et L. Nègre. — Sur la culture du parasite de la lymphangite épizootique. *Bull. Soc. Path. exot.* Séance du 11 avril 1917, n° 4, t. X.

L. Cazalbou. — Au sujet des travaux de MM. L. Nègre et A. Boquet sur le parasite de la lymphangite épizootique du cheval. *Bull. Soc. Path. exot.* Séance du 10 mars 1915, n° 3, t. VIII.

Ducloux. — Sur un protozoaire dans la lymphangite épizootique du mulet en Tunisie. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXIV, n° 13. Séance du 4 avril 1908, p. 593.

Gasperini. — La linfangite protozoaria ed il suo agente specifico *Lymphosporidium equi. Acc. Med. fis. Fiorent.* Séance du 14 mai 1908, *ib.*, f. III, mai-juin 1908.

San Felice. — Ueber die pathogene Wirkung der Blastomyceten. *Zeitschrift für Hyg.*, 1906, t. LIV.

Claudio Fermi et Aruch. — *Centralbl. f. Bakt.*, t. XVII, 10 mai 1895, p. 593.

Marcone. — La Saccaromicosi degli animali. *Atti del R. Instit. d'incorag. di Napoli*, t. VII, 1895.

N. Mori. — Osservazioni sul cosidetto farcino criptococcico, linfangite epizootica o saccaromicosi equina. *La Clinica veter.*, f. 4 et 5, 1908.

A. Thiroux et L. Teppaz. — Contribution à l'étude de la lymphangite épizootique des équidés au Sénégal. *Ann. Inst. Past.*, t. XXIII, 1909, p. 420-425.

H. Tokishige. — Ueber pathogene Blastomyceten. *Centralbl. f. Bakt.*, t. XIX, 1896.

L. Nègre et A. Boquet. — Sur la culture du parasite de la lymphangite épizootique. *Bull. Soc. Path. exot.* Séance du 10 février 1915, n° 2, t. VIII.

32e ANNÉE JUIN 1918 N° 6

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de É. Metchnikoff.

INFECTIONS MICROBIENNES CONSÉCUTIVES A LA PÉNÉTRATION CUTANÉE DES LARVES DE L'ANKYLOSTOME

par E. MALVOZ et J. LAMBINET.

(Institut bactériologique, Liège.

(Avec les planches II, III, IV.)

Une des notions que le maître Metchnikoff a le plus contribué à répandre est le grand rôle joué par les parasites intestinaux comme inoculateurs de virus : faut-il rappeler l'insistance qu'il a mise à vouloir convaincre les médecins que la lutte organisée systématiquement contre les Entozoaires pourrait réduire considérablement le nombre des cas d'appendicite? Et, dans sa belle étude de la *Revue générale des Sciences*, sur l' « Hygiène des intestins » (1), Metchnikoff rappelle toute une série de circonstances dans lesquelles les piqûres des vers intestinaux occasionnent autant de mal que les piqûres des insectes porteurs de microbes pathogènes.

Notre attention a été spécialement attirée sur le rôle des nématodes comme inoculateurs de microbes, depuis que nous

(1) T. XVII, p. 899-906, 30 octobre 1906.

étudions spécialement la biologie de l'ankylostome, études facilitées ici, grâce au matériel considérable dont nous disposons dans notre région de charbonnages et de mines, autrefois gravement infestés par le parasite de l'anémie des mineurs.

Peu après la découverte par Looss du passage de l'ankylostome par la peau, l'un de nous (1) confirmait les constatations de l'éminent parasitologue du Caire, et aujourd'hui, à la suites des recherches de Looss, de Schaudinn, de Herman, de Tenholt, de Boycott, de Bruns et Müller, de Calmette et Breton, des nôtres, l'infection cutanée est considérée comme d'importance prépondérante dans l'ankylostomiase.

La pénétration des larves d'ankylostome par la peau explique divers phénomènes pathologiques notés depuis longtemps chez des individus exposés à la contamination : éruptions tégumentaires prurigineuses, papuleuses, pustuleuses, dermatites, etc. Sans aucun doute, certaines de ces lésions sont dues à des microbes introduits en même temps que les larves. Mais nous nous sommes demandé si les larves ne jouaient pas un autre rôle, si au cours de leur passage à travers l'organisme pour gagner le tube digestif, ces petits organismes ne pouvaient pas, dans certains cas, se comporter comme de véritables convoyeurs de germes pathogènes. Avant d'exposer les résultats intéressants autant que curieux que nous avons obtenus, nous décrirons certaines particularités peu connues de la pénétration des larves d'ankylostome par la peau, particularités qu'il est indispensable de noter si l'on veut pouvoir se rendre compte du mécanisme des infections consécutives à cette pénétration.

On n'admet plus seulement la pénétration des larves par les follicules pileux; la migration larvaire peut s'effectuer à travers les fissures cutanées, et Schüffner va même jusqu'à nier l'introduction de ces petits organismes vivants par les follicules pileux. Qui a raison de ces observateurs ?

Voici quelques expériences absolument démonstratives, et que notre collaborateur, le Dr Albert Dubois, a bien voulu rendre

(1) J. Lambinet, Recherches sur le mode d'infection de l'organisme animal par les larves d'ankylostome. *Bull. Acad. de Méd. de Belgique*, 28 janvier 1905.
Ibid., Recherches sur le trajet des larves d'ankylostome à travers les organes, après infection cutanée. *Ibid.*, 30 décembre 1905.

plus saisissantes par la reproduction microphotographique des préparations.

Déposons sur la peau du ventre d'un chien ou d'un cobaye immobilisés une gouttelette de liquide larvifère (on peut prendre indifféremment les larves de l'ankylostome humain ou de l'ankylostome du chien; les larves parvenues dans l'intestin n'arrivent à maturité que chez l'hôte spécifique; mais, qu'elles appartiennent à l'une ou l'autre espèce, elles possèdent la faculté de traverser indifféremment la peau de l'animal (chien ou cobaye). Laissons le liquide larvifère au contact de la peau pendant une heure et prenons la précaution de l'étaler, après section préalable des poils au ras de la peau, sur une surface d'un bon centimètre carré, recouverte d'une mince lamelle couvre-objet afin que le liquide mouille bien la peau et que toute dessiccation soit empêchée. Après une heure, le morceau de peau est sectionné, puis fixé et débité en coupes colorées, suivant la technique habituelle. Les microphotographies de trois de ces coupes, choisies parmi les plus démonstratives, montrent des détails fort intéressants.

On peut suivre facilement sur ces coupes les divers stades de l'envahissement de la peau par les larves.

La microphotographie (pl. II) montre en 1 la partie restée saine du revêtement cutané; la couche cornée adhère intimement au corps muqueux de Malpighi.

A côté, en 2, on voit une larve (la coupe ne peut en montrer qu'un fragment) à l'entrée d'un follicule pileux, sous la couche cornée. En 3, plusieurs larves décollent la couche cornée et la séparent du corps muqueux. En 4, la lésion épidermique est plus accentuée encore : il s'est formé une véritable bulle remplie de sérosité sanguinolente, de leucocytes et de larves. Sous le corps muqueux de Malpighi, dans toute la région où l'on a déposé le liquide larvifère, le derme est le siège d'une infiltration manifeste.

Pour parvenir entre le corps muqueux et la couche cornée, les larves doivent s'insinuer dans les crevasses superficielles de cette dernière et déterminer des clivages successifs des lamelles épidermiques. Le corps muqueux leur oppose une certaine résistance, son effraction n'est réalisée que difficilement et plus tardivement. Le plus souvent, les larves contournent cet

obstacle en s'engageant dans les orifices des follicules pileux : on les voit s'insinuer entre le poil et sa gaine et, enserrées entre le poil rigide et sa gaine plus dépressible, elles réussissent à franchir cette dernière en l'un ou l'autre point de la hauteur du follicule ; et elles atteignent ainsi le derme et même le tissu sous-cutané. C'est ainsi que doit s'expliquer la présence de la plupart des larves dans les gaines épithéliales des poils, dans les glandes sébacées, dans le derme et le tissu sous-cutané, alors qu'on n'en trouve qu'un très petit nombre passant directement.

Chez le cobaye, dont la peau est plus mince que chez le chien, on trouve plus souvent des larves ayant franchi directement l'épiderme et le derme lui-même, sans avoir suivi la voie des follicules pileux.

Les microphotographies (pl. III et IV) montrent nettement ces diverses particularités.

D'après ces constatations, il faut se rallier plutôt à l'opinion de Looss qu'à celle de Schüffner. Ce dernier observateur, n'ayant pas trouvé de larves dans les follicules pileux, en avait conclu qu'elles se créaient un chemin direct à travers la peau ; Looss affirmait, au contraire, que l'introduction de ces petits organismes ne pouvait se faire que par la voie des follicules. En thèse générale, c'est cette voie qui peut être considérée comme le mode de pénétration habituel. Nous rappellerons, à ce propos, que l'un de nous a signalé cette tendance des larves à s'engager dans les orifices qui s'ouvrent devant elles, en décrivant la pénétration de quelques-unes d'entre elles dans le conduit excréteur des glandes de la muqueuse bronchique (trachée), au moment de leur passage dans le poumon, après infection cutanée.

Quel que soit le mode de pénétration des larves de nématodes dans la peau, il n'est pas douteux que les lésions cutanées si variées, et que l'on a décrites sous les noms les plus divers chez les personnes exposées à la contamination par les larves d'ankylostome, ne soient dues, en partie, à des infections microbiennes associées : il suffit de jeter un coup d'œil sur nos coupes pour se rendre compte de l'importance des effractions que ces parasites sont capables de produire dans le revêtement cutané.

Mais, à côté de ce rôle des ankylostomes comme inoculateurs de virus, n'en existe-il pas un autre, d'importance plus générale, qui consisterait dans le transport par les larves, dans leur migration à travers l'organisme, de la peau à l'intestin, de certains microbes pathogènes pouvant se rencontrer dans les milieux contaminés par les déjections et les excreta où se développe l'œuf du nématode; en d'autres termes, les larves de l'ankylostome ne pourraient-elles se comporter comme de véritables « convoyeurs » de germes infectieux?

Nous avons entrepris toute une série d'investigations pour répondre à cette question. La recherche consiste, en général, à étaler sur la peau du ventre de l'animal du liquide larvifère additionné de microbes tels que le bacille du charbon, le bacille de la tuberculose, le staphylocoque, le streptocoque, etc., puis à tenir l'animal en observation en même temps qu'un témoin traité de la même façon, mais sans ajouter des larves aux microbes déposés sur la peau.

Le résultat d'une de ces expériences est tellement démonstratif qu'aucun doute ne peut subsister sur l'extrême rapidité de la généralisation du processus tuberculeux quand on dépose à la fois, sur la peau du cobaye, des larves et des bacilles de Koch. Voici cette expérience :

Deux cobayes sont immobilisés, fixés sur le dos à la table d'expérimentation afin qu'ils ne puissent ni se retourner ni se lécher. On coupe les poils de la peau du ventre sur une surface de 2 centimètres carrés; on étale à cet endroit un peu de crachat très riche en bacilles de Koch; puis, chez l'un des animaux, on laisse tomber à cet endroit une goutte de liquide larvifère (larves d'*Ankylostomum caninum*) renfermant de nombreuses larves enkystées, très actives, cultivées à 28°. Un couvre-objet empêche la dessiccation de la peau de part et d'autre.

Puis on désinfecte soigneusement la partie de la peau où ont été déposés les produits infectants, au moyen d'une forte solution de lysol. Les animaux sont placés dans des cages séparées.

Après un mois, le cobaye témoin paraît absolument sain, alors que son congénère est trouvé mort dans sa cage.

L'autopsie de celui-ci révèle une tuberculose généralisée, avec nombreux tubercules dans les poumons, le foie, la rate, lésions très riches en bacilles de Koch. Le cobaye témoin, tué après un mois et demi, ne montre aucune lésion tuberculeuse.

Cette généralisation presque immédiate de la tuberculose chez ce cobaye, sur la peau duquel on avait semé des larves et des bacilles de la tuberculose, ne peut s'expliquer que par une dissémination rapide des bacilles convoyés par les larves à travers la peau et amenés avec elles dans le torrent circulatoire : le résultat a été le même que si on avait poussé directement une injection de bacilles dans une veine.

Dans des expériences conduites de la même façon avec les bacilles du charbon mélangés aux larves d'ankylostome, nous avons obtenu plus régulièrement l'infection charbonneuse d'origine cutanée là où la pénétration des bacilles était facilitée par l'introduction des larves.

Ces recherches expérimentales, qui ne sont que le début d'un travail plus considérable, sont de nature à expliquer bien des complications de l'ankylostomiase : leur résultat prouve, en tout cas, que l'infection cutanée dans l'ankylostomiase n'est pas seulement dangereuse par elle-même, mais encore par la porte qu'elle ouvre à d'autres infections microbiennes.

SUR L'ORIGINE DES MYOPHAGES

par le professeur TH. TCHISTOVITCH (Kasan).

Trente ans se sont écoulés à peu près depuis que M. É. Metchnikoff avait conçu l'idée du rôle de la phagocytose dans la biologie. Une vive lutte a eu lieu durant cette longue série d'années pour assurer à cette découverte géniale la place si importante qu'elle occupe dans la science en ce moment. Pendant 30 années, la découverte de M. Metchnikoff renversait dans sa marche triomphale les nombreux obstacles et toutes les objections que les adversaires de cette théorie audacieuse amassaient de tous côtés sur son chemin.

La théorie même de la phagocytose est à présent admise partout. Mais, jusqu'à nos jours, ne se sont pas encore apaisées les discussions concernant quelques détails : c'est, d'un côté, la portée de la phagocytose dans certains phénomènes d'immunité et dans le mécanisme de la disparition des cellules dans les organes en voie d'atrophie; d'un autre côté, c'est la question de l'origine des cellules phagocytaires. Laissant de côté la première question, arrêtons-nous sur la dernière.

M. Metchnikoff a établi, dans ses premiers travaux sur la phagocytose, deux espèces de phagocytes : les microphages et les macrophages. Les premiers ne sont autre chose que les leucocytes polynucléaires du sang, doués de la faculté d'émigrer à travers les parois des vaisseaux sanguins, comme l'avait démontré Cohnheim, et de s'amasser dans les foyers d'inflammation, en se déplaçant à force de mouvements amiboïdes. L'aspect des microphages est si caractéristique, que leur identité avec les polynucléaires du sang n'était jamais mise en doute.

Les macrophages — phagocytes mononucléés — se présentent aussi comme éléments mobiles ; mais, ne possédant aucun

signalement précis; ils ressemblent par conséquent aussi bien aux jeunes cellules de beaucoup de tissus, tant que celles-ci ne se sont pas encore différenciées et n'ont pas encore perdu leur caractère embryonnaire; c'est pour cette raison qu'on admet que les phagocytes qui apparaissent dans les foyers inflammatoires peuvent, dans différentes circonstances, avoir une origine diverse.

Metchnikoff lui-même, dans un de ses premiers articles sur la phagocytose (1), se prononça en faveur d'une origine multiple des macrophages. Suivant les circonstances, ce sont une fois des cellules conjonctives (endothéliales, cellules migratrices du mésoderme) et les leucocytes mononucléés ou les lymphocytes du sang (comme, par exemple, dans la phagocytose des globules rouges du sang, du tissu nerveux, des cellules animales en général, des pigments, etc., Metchnikoff, J. Bordet, Savtchenko, Cantacuzène et autres); une autre fois ce sont les cellules du sarcoplasma, les cellules musculaires (Waldeyer, Weber, Metchnikoff, Soudakéwitch, Saltykow et beaucoup d'autres); dans d'autres cas encore, ce sont les cellules névrogliques du tissu nerveux (Metchnikoff et surtout Alzheimer et ses élèves). Or, plus tard, la question de l'origine des macrophages devint plusieurs fois le point de discussions et de controverses. C'est surtout après les travaux bien connus du professeur A. Maximow sur l'inflammation, qui avait attribué aux lymphocytes une capacité si grande de se transformer en cellules des foyers inflammatoires, qu'on eut la tendance d'envisager la plupart des macrophages comme éléments issus des lymphocytes émigrés des vaisseaux sanguins, ou préexistant sur place, même dans les voies lymphatiques; ces lymphocytes, en augmentant de volume, acquerraient une mobilité amiboïde prononcée, de même qu'un grand pouvoir phagocytaire. Parmi les auteurs qui rapprochaient les macrophages surtout des lymphocytes, je citerai, par exemple, Borrel (dans la tuberculose) et Cantacuzène (dans la phagocytose des cellules hépatiques).

La participation d'autres cellules, provenant d'autres tissus que le sang (par exemple : cellules musculaires, névro-

(1) *Biol. Centralbl.*, 1883, p. 560, et *Année biologique*, 1897, p. 253.

gliques, etc.), à la phagocytose des résidus d'organes lésés devrait, à ce point de vue, être très restreinte, sinon nulle.

Cette divergence des opinions fut le point de départ de nombreuses études expérimentales, dont les résultats, ordinairement contradictoires, n'avancèrent guère la solution de la question : c'est qu'on ne possédait pas encore une méthode permettant de déterminer sous le microscope l'origine des jeunes cellules appartenant à différents tissus, par exemple, de distinguer les jeunes cellules musculaires des fibroblastes, etc. ; pour cette raison, tous les expérimentateurs étaient forcés de baser leurs conclusions seulement sur leurs impressions personnelles.

Le professeur Ehrlich, pour différencier les cellules de nature diverse, chercha des colorants, qui les distingueraient infailliblement les unes des autres.

Les travaux d'Ehrlich dans cette direction ont permis de déterminer, par des colorations spéciales, la provenance de certaines cellules. Nous entendons la méthode de coloration *in vivo* par les solutions de pyrrholblau ou trypanblau, méthode proposée par Ehrlich et étudiée par Goldmann. Ces deux colorants, relativement inoffensifs pour l'organisme, injectés aux animaux sous la peau, dans le péritoine ou dans le sang même, ne colorent que certaines cellules, en se déposant dans leur protoplasma en forme de gouttelettes ou de grains bleu foncé. C'est le cas des cellules épithéliales des tubes contournés du rein et des clasmatocytes du tissu conjonctif, les fibroblastes ne se colorant que d'une façon très faible et toute différente (leurs chondriocontes délicats prennent une faible teinte bleu clair). En se servant d'une technique appropriée, on peut ainsi préparer des animaux dont toutes les cellules conjonctives appartenant au type des clasmatocytes apparaissent bleues, tandis que les éléments du sang et tous les autres tissus restent incolores. Si l'on produit chez de tels animaux préparés des foyers d'inflammation, on voit s'y amasser des phagocytes, les uns émigrés des vaisseaux sanguins, les autres provenant des fibroblastes et des clasmatocytes locaux. Ces derniers gardent leur couleur bleu foncé, même dans les foyers inflammatoires. On arrive de cette façon à bien distinguer les phagocytes de provenance hématogène ou lymphogène de la vraie

descendance des clasmatocytes conjonctifs, puisque non seulement les lymphocytes mêmes, mais aussi les « plasmazellen » (cellules plasmatiques de Unna), qui se forment à leurs dépens, restent incolores ; il en est de même des grandes cellules mononucléaires : malgré leur identité morphologique avec les macrophages histiogènes, elles restent néanmoins incolores (1).

Cette observation intéressante de Goldmann, confirmée depuis par Tchachine et Schulemann, a été utilisée dans mon laboratoire par le Dr Taratynov (2) pour résoudre le problème de l'origine des phagocytes qui détruisent les fibres musculaires, lésées ou nécrosées.

Ayant préparé par des injections successives (sous la peau et dans le péritoine) de pyrrholblau et de trypanblau des animaux de laboratoire jusqu'à ce que leur peau et les muqueuses aient acquis une teinte bleue prononcée, Taratynov a provoqué chez eux, par des moyens différents, des lésions de muscles striés et a examiné ces foyers à divers intervalles. Il en résulta que les noyaux musculaires (corpuscules de Max Schultze) ne prenaient jamais la couleur bleue, de même que les sarco- ou myoblastes qui proviennent des bouts des fibres musculaires survivants. Il a pu de la sorte être établi définitivement que les cellules et les noyaux musculaires ne prennent aucunement part à la destruction (résorption) des muscles lésés ; ces cellules contribuent exclusivement à la régénération et à la croissance des bourgeons des fibres musculaires mêmes. Il résulte d'un autre côté que les éléments mononucléés qui digèrent la substance musculaire proviennent, pour la plus grande majorité, sinon exclusivement, des cellules conjonctives du périmysium, notamment *des clasmatocytes* de Ranvier. Au bout de 24-48 heures après la lésion (pendant ce temps s'amassent autour des muscles lésés des leucocytes polynucléaires, microphages), tous les espaces entre les fibres musculaires de cette région, et même les sarcolemmes, se remplissent de

(1) Il arrive pourtant que des grains bleus y apparaissent, par suite d'une phagocytose de quelques macrophages bleus dégénérés.

(2) Sur la destruction des muscles lésés et sur l'origine des myophages, *Thèse* de Kasan, 1914 (en russe), et *Comptes rendus de la Soc. de Biologie* de Paris, 1914.

macrophages bleus : ce sont ces agglomérations de cellules mononucléaires à l'intérieur des sarcolemmes des muscles lésés qu'avait autrefois observées Metchnikoff, et que Waldeyer avait décrites en détail ; on leur donna depuis le nom de « muskelzellenschläuche » (tubes à cellules musculaires de Waldeyer). Pendant très longtemps on en débattit le rôle : les uns les tenaient pour des noyaux musculaires multipliés (Metchnikoff, Soudakéwitch, Volkmann, Saltykow et beaucoup d'autres observateurs), les autres insistaient sur leur nature leucocytaire (Maslovsky, Erbkam, Rochmaninow, Schminke, etc.), et ce ne furent que quelques expérimentateurs qui firent l'observation que ces cellules périssent finalement et ne se transforment jamais en fibres musculaires nouvelles (Waldeyer, Bouchard, Neumann, Barfurth, Askanazy, Volkmann et autres). La récente méthode d'Ehrlich-Goldmann, qui a permis d'élucider d'une façon sûre l'origine des myophages et d'établir leur parenté avec les clasmatocytes du périmysium, a démontré en même temps que les « muskelzellenschläuche » de Waldeyer ne contiennent autre chose que des myophages et pas de myoblastes. Tous ces amas de cellules bleues disparaissent au moment où commence à se produire la régénération des fibres musculaires, qui s'opère ou bien par un accroissement de bourgeons protoplasmiques (musculaires), issus des bouts des fibres striées lésées, ou bien par la multiplication des cellules musculaires (noyaux) des sarcolemmes, qui se transforment respectivement en sarcoblastes ou en myoblastes. Nous ne sommes pas encore en état d'affirmer que la résorption physiologique des muscles pendant la transformation des animaux (des têtards, des larves, etc.) s'opère de la même façon (1) ; mais, si l'on prend en considération les observations des zoologistes recueillies par nous dans la littérature, il devient probable que le myophagisme physiologique n'en diffère en rien et que les myophages dans la métamorphose sont de même des cellules conjonctives (du mésenchyme). Par conséquent, on peut considérer comme prouvé, du moins en ce qui concerne la phagocytose des muscles, que ce sont les cellules conjonctives spé-

(1) L'étude de cette question se poursuit dans mon laboratoire par M. Taratynov.

ciales du périmysium qui jouent le rôle de myophages, mais qu'ensuite celles-ci ne prennent aucune part à la régénération ultérieure. Les éléments sanguins contribuent peu au myophagisme : ce fait a déjà été noté autrefois par Metchnikoff, qui affirmait que les phagocytes des muscles proviennent du tissu musculaire même, et non pas du sang. Cette opinion ne doit être modifiée à présent qu'en ce qui concerne le détail suivant : ce ne sont pas les cellules musculaires, mais les clasmatocytes du périmysium qui jouent le rôle de myophages tandis que la participation au myophagisme des éléments sanguins se borne à l'émigration de microphages durant les premières 36-48 heures après la lésion ; et si même on admettait que les lymphocytes ou quelques autres éléments provenant de ces derniers contribuent à la résorption des muscles, leur rôle devrait être considéré comme minime et sans aucune valeur.

LA DÉSINFECTION
DES PORTEURS DE BACILLES DIPHTÉRIQUES

par JACQUES ROSKAM,
Médecin-adjoint à l'Armée belge,
Assistant à l'Hôpital Saint-Idesbald (Belgique).

En découvrant un sérum antitoxique spécifique, Behring et Kitasato, puis Roux dotèrent la médecine d'une arme extrêmement puissante contre la diphtérie aiguë. Grâce à eux, la mortalité des sujets atteints de diphtérie a considérablement baissé et l'on peut presque affirmer aujourd'hui qu'un diphtérique guérira certainement s'il est injecté de sérum, en quantité suffisante, dès les premières heures de la maladie.

Le sérum est aussi d'un grand secours dans la prophylaxie de la diphtérie : vingt années d'expériences montrent que « l'on doit, systématiquement, pratiquer l'inoculation préventive de sérum antidiphtérique à tous les sujets d'une collectivité où la diphtérie apparaît et se propage, lorsque les risques de contagion sont particulièrement menaçants, par suite de la constance ou de l'intimité des contacts (famille, école, hôpital) ou lorsque les sujets sont particulièrement exposés aux atteintes ou prédisposés à la gravité du mal par leur jeune âge ou par un état morbide antérieur » (Mosny).

Toutefois, les injections préventives de sérum ne constituent pas, à elles seules, une mesure prophylactique suffisante : l'immunité conférée est de courte durée (3 ou 4 semaines au maximum); en outre, les injections ne peuvent être pratiquées que dans des conditions bien déterminées. C'est pourquoi il convient de compléter la prophylaxie antidiphtérique par d'autres mesures, d'autant plus efficaces que la morbidité par diphtérie s'est fort accrue, ces dernières années, en Europe centrale. Le fait a été constaté par différents auteurs; il a été notamment démontré par Sobernheim au Congrès de microbiologie de Berlin en 1913 : depuis 1907, une onde diphtérique

(*eine Diphteriewelle*) s'est étendue sur l'Allemagne et tend à se propager dans les pays voisins. Il y a là une menace contre laquelle il faut s'armer, dès maintenant, le mieux possible.

On admet aujourd'hui, quasi unanimement, que la propagation de la diphtérie se fait surtout par les sujets malades et les convalescents de diphtérie; les porteurs sains de bacilles de Lœffler jouent également un certain rôle dans l'épidémiologie de cette affection. Ces notions classiques ont orienté la lutte contre la diphtérie vers l'isolement des porteurs de germes, malades, convalescents ou sains.

Cet isolement étant une mesure pénible à la fois pour les patients et la collectivité, il importait de réduire sa durée au minimum, de débarrasser le plus rapidement possible de leurs germes les porteurs de bacilles de Lœffler.

Nous avons pu, à l'hôpital Saint Idesbald, apprécier la valeur relative des différentes méthodes préconisées pour la stérilisation des porteurs de bacilles diphtériques (1). De nombreux diphtériques — la plupart enfants — y ont été soignés; il importait de ne les rendre à leur famille qu'après stérilisation de leur rhino-pharynx. Nous y avons également traité un grand nombre de porteurs sains de germes : le bombardement des villages voisins de la ligne de feu entraînant l'évacuation de leur population infantile vers des colonies scolaires, nous eûmes à débarrasser de leurs germes ceux de ces enfants dont le rhino-pharynx contenait des bacilles de Lœffler.

Dans ce but, les diphtériques, les convalescents de diphtérie et les porteurs sains de bacilles de Lœffler furent soumis à un traitement local, qui, chez les premiers, succéda, bien entendu, au traitement général sérothérapique.

Jusqu'au 1er août 1916, ce traitement local consista en une grande irrigation des cavités buccale et pharyngée avec une solution aqueuse de phénosalyl (1 cuiller à soupe de phénosalyl dans 1 litre d'eau) suivie d'un badigeonnage des amygdales et du pharynx au moyen d'un tampon imbibé de glycérine iodée à 2 p. 100, et d'une instillation nasale d'huile résorcinée mentholée (résorcine : 2 p. 100; menthol : 0,50 p. 100). Cette

(1) Nos premiers résultats ont fait l'objet d'une note dans les *Archives médicales belges*, 70e année, n° 5, mai 1917, 406-411.

médication était habituellement appliquée matin et soir, une heure après les repas.

Lorsque les germes résistaient de façon anormale à ce traitement, il était répété 3, voire 4 fois par jour; dans les intervalles, les malades faisaient alors des inhalations de vapeurs d'iode, de thymol et de créosote.

Chaque semaine, le traitement était interrompu pendant une journée. Le lendemain matin, un prélèvement abondant des mucosités du rhino-pharynx était pratiqué à l'aide d'un écouvillon d'ouate stérile; pour chaque sujet, nous veillions à ce que l'écouvillon ramenât des mucosités de nombreux endroits de l'arrière-nez, du pharynx et des amygdales. Ces mucosités étaient alors frottées sur du sérum de bœuf coagulé en tube incliné et stérilisé. Les tubes ensemencés étaient mis à l'étuve à 37° C. Après 20 à 24 heures d'étuve, les colonies étaient examinées macroscopiquement et microscopiquement (coloration par le bleu de Roux et par la méthode de Gram, éventuellement par le procédé de Neisser). L'examen bactériologique des mucosités était considéré comme négatif, lorsqu'après une journée d'étuve à 37°, le raclage des tubes de sérum ensemencés au moyen de ces mucosités ne ramenait pas de bacilles diphtériques longs, moyens, courts à corpuscules polaires, ni de colonies confluentes de bacilles diphtériques courts. Après deux examens négatifs successifs, le sujet était considéré comme indemne et évacué.

Nous avons soumis au traitement local antiseptique 53 diphtériques et 28 porteurs sains de bacilles de Lœffler.

Des *diphtériques*, 47 furent débarrassés de leurs germes en moins de 60 jours : c'est la normale (tableau I).

Trois d'entre eux conservèrent leurs germes moins de 10 jours;

Quatre les virent disparaître du 10e au 20e jour;

Huit, du 20e au 30e jour;

Quatorze, du 30e au 40e jour;

Douze, du 40e au 50e jour;

Six, du 50e au 60e jour.

En moyenne, ces diphtériques furent stérilisés en *34,9 jours*.

Six autres malades conservèrent leurs bacilles plus longtemps,

respectivement 73, 78, 81, 101, 108 et 116 jours. En tenant compte de ces cas exceptionnellement résistants, les diphtériques ne furent stérilisés, par la méthode antiseptique, qu'après *41,1 jours.*

Tableau I. — **Stérilisation du rhino-pharynx par la méthode antiseptique. Diphtéries aiguës.**

	NOMBRE DE DIPHTÉRIQUES DÉBARRASSÉS DE LEURS GERMES :									
	avant le **10**e jour :	du **10**e au **20**e jour :	du **20**e au **30**e jour :	du **30**e au **40**e jour :	du **40**e au **50**e jour :	du **50**e au **60**e jour :	du **70**e au **80**e jour :	du **80**e au **90**e jour :	du **100**e au **110**e jour :	du **110**e au **120**e jour :
	3	4	8	14	12	6	2	1	2	1
Nombre de jours au bout desquels les différents diphtériques furent débarrassés de leurs germes :	10	14	21	32	42	51	73	81	101	116
	8	17	26	31	41	53	78		108	
	10	19	26	32	41	53				
		19	23	34	41	55				
			23	38	45	53				
			23	32	43	60				
			29	39	42					
			24	38	49					
				31	49					
				35	48					
				36	44					
				39	49					
				36						
				35						

Les *porteurs sains de bacilles de Lœffler* se montrèrent plus rebelles encore au traitement antiseptique (tableau II).

Sur 25, 22 conservèrent leurs germes de 15 à 70 jours.

Trois d'entre eux furent stérilisés en moins de 20 jours;

Trois, entre le 20e et le 30e jour;

Cinq, entre le 30e et le 40e jour;

Quatre, entre le 40e et le 50e jour;

Deux, entre le 50e et le 60e jour;

Cinq, entre le 60e et le 70e jour.

En moyenne, ces porteurs sains de germes ne furent stérilisés qu'après *42,7 jours.*

Trois porteurs, exceptionnellement résistants, conservèrent leurs bacilles respectivement 81, 105 et 158 jours. En les comptant, les porteurs sains de bacilles de Lœffler ne furent

débarrassés de leurs germes, par la méthode antiseptique, qu'après un temps moyen de *51,3 jours.*

TABLEAU II. — **Stérilisation du rhino-pharynx par la méthode antiseptique. Porteurs sains de germes diphtériques.**

	NOMBRE DES PORTEURS DE GERMES STÉRILISÉS :								
	avant le 20e jour :	du 20e au 30e jour :	du 33e au 40e jour :	du 40e au 50e jour :	du 50e au 60e jour :	du 60e au 70e jour :	du 80e au 90e jour :	du 100e au 110e jour :	du 150e au 160e jour :
	3	**3**	**5**	**4**	**2**	**5**	**1**	**1**	**1**
Nombre de jours au bout desquels les différents porteurs de germes furent stérilisés :	18	22	39	43	58	61	81	105	158
	15	26	40	50	56	64			
	20	26	38	47		63			
			38	45		70			
			37			63			

Trois autres porteurs, que nous soumîmes au traitement antiseptique, furent ultérieurement atteints d'angine diphtérique : nous en reparlerons plus loin.

D'août 1916 à février 1917, nous traitâmes nos porteurs de bacilles diphtériques, malades, convalescents et sains, par des insufflations de poudre de sérum antimicrobien de l'Institut Pasteur.

Ce sérum a été préparé la première fois par Louis Martin : ne pouvant obtenir à l'aide du sérum antidiphtérique ordinaire, surtout antitoxique, la stérilisation rapide des porteurs de germes, L. Martin fabriqua un sérum antimicrobien par injection au cheval de bacilles de Lœffler, chauffés à 100° pendant une heure; il administra ce sérum localement, sous forme de pastilles qu'il fit sucer par les porteurs de bacilles diphtériques, à la dose d'une dizaine par jour.

Pour permettre l'action du sérum antimicrobien sur les parois des cavités nasales, Dopter le pulvérisa et conseilla de prendre 8 à 10 prises de poudre de sérum par jour.

Les événements actuels m'ont empêché de rassembler les

résultats obtenus par l'emploi du sérum antimicrobien, avant la guerre. Qu'il me soit permis de rappeler simplement avec M. Labbé et Canat que « des essais faits par Dopter, par Roussel, Lesterlin et Sicre, par Darré, Dujarric de la Rivière et Rouché, trop peu nombreux encore pour permettre un jugement, avaient aussi fait heureusement augurer de la méthode ».

Depuis la guerre, P. Ravaut et Magne, M. Labbé et Canat, puis Benard ont publié les résultats qu'ils ont obtenus à l'aide du sérum antimicrobien pulvérisé.

P. Ravaut et Magne fabriquèrent une poudre complexe à base de sérum antimicrobien pulvérisé, auquel ils mélangèrent de l'acide borique, du talc, du camphre et, contre les associations fuso-spirillaires, de l'arsénobenzol. En faisant priser 2 fois par jour, dans chaque narine, une forte pincée de cette poudre, puis en l'insufflant directement sur les amygdales et le pharynx à l'aide d'un simple soufflet à poudre insecticide, ils obtinrent la stérilisation du rhino-pharynx de 16 diphtériques et de 20 porteurs de germes après un temps moyen de 16,9 jours; par des gargarismes et des pulvérisations antiseptiques, des écouvillonnages iodés du rhino-pharynx, etc., ils n'avaient réussi à stériliser 41 diphtériques qu'après un temps moyen de 36,2 jours.

M. Labbé et Canat obtinrent également d'excellents résultats en se servant de la poudre de sérum antimicrobien, insufflée 4 fois par jour à l'aide de l'appareil de l'Institut Pasteur. Alors que, par de grands lavages de gorge avec de l'eau additionnée de liqueur de Labarraque (30 p. 1.000), par l'introduction de pommade résorcinée au 1/10 dans les fosses nasales et par le badigeonnage de la gorge à la glycérine iodée à 1/30, répétés 2 fois par jour, ils n'avaient obtenu la stérilisation du rhino-pharynx de 20 diphtériques qu'après un temps moyen dépassant 40 jours, la sérothérapie antimicrobienne leur permit de débarrasser 35 diphtériques de leurs germes en une moyenne de 24 jours.

Les quelques résultats que rapporte Benard plaident aussi en faveur du sérum antimicrobien.

Nous avons également expérimenté la méthode Martin avec succès.

L'appareil que M. Louis Martin a eu la grande amabilité de mettre à notre disposition se compose d'un petit flacon de

verre, sur lequel se visse un insufflateur à poire de caoutchouc; la poudre de sérum sort du flacon par un tube de caoutchouc, auquel peuvent s'adapter des embouts de verre, droits ou coudés, à bord rodés.

La poudre de sérum est conservée dans un flacon spécial, à bouchon fermant hermétiquement, muni d'un dessiccateur. Il importe de tenir ce flacon toujours fermé et de ne retirer, à chaque séance, que la quantité de sérum pulvérisé strictement nécessaire à l'insufflation : même dans le flacon insufflateur, la poudre de sérum s'humidifie et perd de sa pulvérulence.

Avant d'être insufflés, les patients mouchent alternativement l'une et l'autre narine. Il leur est ordonné d'inspirer fortement en même temps qu'ils sont insufflés et de s'abstenir de tousser et de se moucher après l'opération.

On introduit successivement le tube de verre de l'insufflateur dans chaque narine et, par pression brusque de la poire de caoutchouc, on envoie 2 ou 3 jets de poudre de sérum dans chaque fosse nasale. Même opération est pratiquée dans la bouche, pour laquelle on peut utiliser les tubes coudés permettant mieux d'atteindre le pharynx par voie buccale.

Les embouts de verre sont changés pour chaque malade et désinfectés après la séance d'insufflation, par ébullition. Ces insufflations nasales et pharyngées étaient pratiquées 2 fois par jour, matin et soir, après les repas.

Nous avons appliqué le traitement à 49 diphtériques et à 65 porteurs sains de bacilles de Lœffler.

La plupart des *diphtériques* (45) conservèrent leurs germes moins de 50 jours (tableau III).

Neuf en furent débarrassés en moins de 10 jours ;

Douze furent stérilisés du 10ᵉ au 20ᵉ jour;

Quatorze, du 20ᵉ au 30ᵉ jour;

Cinq, du 30ᵉ au 40ᵉ jour ;

Cinq autres, du 40ᵉ au 50ᵉ jour.

En moyenne, ces cas normaux conservèrent leurs germes *21,5 jours*.

Quatre malades furent plus difficilement débarrassés de leurs bacilles : ils les conservèrent 59, 81, 91 et 175 jours. Ces quatre cas anormaux élèvent à *28 jours* la durée moyenne de la persistance des bacilles de Lœffler dans le rhino-pharynx

des malades traités par les insufflations de sérum antimicrobien pulvérisé.

Tableau III. — **Stérilisation du rhino-pharynx par insufflation de poudre de sérum antidiphtérique antimicrobien. Diphtéries aiguës.**

	Nombre de diphtériques débarrassés de leurs germes :								
	avant le 10e jour : 9	du 10e au 20e jour : 12	du 20e au 30e jour : 14	du 30e au 40e jour : 5	du 40e au 50e jour : 5	du 50e au 60e jour : 1	du 80e au 90e jour : 1	du 90e au 100e jour : 1	du 170e au 180e jour : 1
Nombre de jours au bout desquels les différents diphtériques furent débarrassés de leurs germes :	7	15	29	36	41	59	81	91	175
	8	14	24	36	41				
	8	18	21	36	41				
	8	11	24	36	42				
	8	12	21	32	50				
	10	18	21						
	10	11	27						
	3	15	25						
	7	11	25						
		15	22						
		13	25						
		13	29						
			28						
			21						

Les *porteurs sains de bacilles diphtériques* ont été plus rapidement débarrassés de leurs germes par la méthode Martin que les malades soumis au même traitement (tableau IV).

Des 65 porteurs sains, 62 furent stérilisés en moins de 50 jours :

Vingt et un le furent en moins de 10 jours ;

Vingt-deux, entre le 10e et le 20e jour ;

Neuf, entre le 20e et le 30e jour ;

Six, entre le 30e et le 40e jour ;

Quatre, entre le 40e et le 50e jour.

Le temps moyen nécessaire à la stérilisation des porteurs sains de germes diphtériques par la méthode Martin est normalement de *18,5 jours*.

Deux porteurs exceptionnellement résistants, qui conservèrent leurs germes respectivement 96 et 102 jours, élèvent ce temps moyen à *21 jours*.

Le 65[e] porteur de bacilles de Lœffler fit, au cours de son séjour à l'hôpital, une angine diphtérique à fausses membranes. Nous en reparlerons bientôt.

TABLEAU IV. — **Stérilisation du rhino-pharynx par insufflation de poudre de sérum antidiphtérique antimicrobien. Porteurs sains de germes diphtériques.**

	NOMBRE DE PORTEURS SAINS DE GERMES STÉRILISÉS :						
	avant le **10**[e] jour : **21**	du **10**[e] au **20**[e] jour : **22**	du **20**[e] au **30**[e] jour : **9**	du **30**[e] au **40**[e] jour : **6**	du **40**[e] au **50**[e] jour : **4**	du **90**[e] au **100**[e] jour : **1**	du **100**[e] au **110**[e] jour : **1**
Nombre de jours au bout desquels les différents porteurs de germes ont été stérilisés :	9	15	22	34	48	96	102
	9	13	26	35	50		
	9	13	23	36	49		
	9	18	23	38	49		
	7	16	23	36			
	7	16	21	38			
	7	16	22				
	7	16	29				
	7	19	21				
	7	19					
	7	16					
	7	19					
	7	18					
	8	19					
	8	14					
	8	14					
	10	11					
	10	20					
	10	15					
	9	15					
	9	15					
		18					

Un simple regard jeté sur les tableaux I et III, II et IV où sont détaillés nos résultats, nous montre que, pour la stérilisation des porteurs de bacilles de Lœffler, atteints ou non de diphtérie, la méthode Martin est nettement supérieure à la méthode antiseptique ; elle permet de débarrasser les porteurs de leurs germes beaucoup plus rapidement que ne le fait cette dernière : par la comparaison des différents temps moyens, nous voyons que le gain de temps réalisé grâce à la méthode Martin est de 33 p. 100, quand il s'agit de convalescents de

diphtérie, de 59 p. 100, quand il s'agit de porteurs sains de bacilles de Lœffler.

Il est probable que, par une plus fréquente répétition des séances d'insufflation, la stérilisation des porteurs de bacilles diphtériques pourrait être obtenue plus rapidement encore. Afin de pouvoir comparer les résultats qu'allait nous fournir la méthode Martin avec ceux que nous avions obtenus par la méthode antiseptique, nous n'avions fait insuffler nos porteurs de germes que deux fois par jour. Ultérieurement, nous fîmes insuffler quatre fois par jour un lot de 25 porteurs sains de bacilles de Lœffler : ils furent plus rapidement stérilisés que ceux qui avaient reçu seulement deux insufflations par jour (tableau V).

Tableau V. — **Stérilisation du rhino-pharynx par insufflation de poudre de sérum antidiphtérique antimicrobien. Traitement intensif. Porteurs sains de germes diphtériques.**

	Nombre de porteurs sains de germes stérilisés :					
	avant le 10e jour : 15	du 10e au 20e jour : 6	du 20e au 30e jour : 1	du 30e au 40e jour : 1	du 40e au 50e jour : 1	du 60e au 70e jour : 1
Nombre de jours au bout desquels les différents porteurs de germes ont été stérilisés :	7	11	21	33	42	63
	7	11				
	7	14				
	7	12				
	10	13				
	7	16				
	7					
	7					
	10					
	10					
	6					
	7					
	6					
	6					
	10					

En effet, de ces 25 porteurs quinze furent débarrassés de leurs germes pendant les 10 premiers jours de leur traitement ;

Six furent stérilisés du 10e au 20e jour ;

Un, du 20e au 30e ;

Un, du 30e au 40e ;
Un, du 40e au 50e.

Ces 24 cas normaux furent stérilisés après un temps moyen de *11,9 jours*.

Le 25e porteur, qui conserva ses germes 63 jours, élève la moyenne globale à *14 jours*.

Rappelons que les porteurs sains de bacilles de Lœffler, traités par les insufflations biquotidiennes de sérum antimicrobien, ne furent stérilisés qu'après un temps moyen normal de *18,5 jours*, global de *21 jours*.

Nous avons mentionné plus haut que 3 des 28 porteurs sains de bacilles de Lœffler soignés à St-Idesbald par la méthode antiseptique furent atteints, au cours de leur traitement, d'angine diphtérique à fausses membranes, respectivement 9, 10 et 38 jours, après leur entrée à l'hôpital ; ces 3 cas représentent 10,7 p. 100 du nombre total des porteurs sains de germes soumis à la médication antiseptique.

Des 90 porteurs sains de bacilles de Lœffler traités par la méthode Martin, un seul présenta, au cours de son traitement, des accidents diphtériques aigus : il fut atteint d'angine diphtérique à fausses membranes, 15 jours après son entrée à l'hôpital. Ce cas unique ne représente que 1,1 p. 100 du nombre total des porteurs sains de bacilles de Lœffler, que nous traitâmes par des insufflations de sérum antidiphtérique anti microbien pulvérisé.

La rareté relative du nombre des cas de diphtérie aiguë se déclarant chez les porteurs sains de germes soignés par la méthode Martin est également un argument — moins puissant toutefois que les résultats rapportés plus haut — en faveur du traitement des porteurs de bacilles de Lœffler, par des insufflations de poudre de sérum.

Nos résultats concordent donc entièrement avec ceux des auteurs qui ont essayé la sérothérapie antimicrobienne locale pour la désinfection des porteurs de bacilles diphtériques.

Toutefois, avant la guerre, le professeur Nolf avait essayé, à Liége, de débarrasser de leurs germes les porteurs de bacilles de Lœffler, par des insufflations de pastilles de sérum Martin

pulvérisées : les résultats qu'il obtint par ce traitement furent inférieurs à ceux que lui avait donnés la méthode antiseptique.

Pour trouver la raison de cette divergence de résultats, nous traitâmes, sur les conseils de M. Nolf, un lot de porteurs de bacilles diphtériques par des insufflations de sérum *antiméningococcique* pulvérisé, préparé par l'Institut Pasteur pour la stérilisation des porteurs de méningocoques.

De février 1917 à juillet 1917, nous avons soumis 28 diphtériques et 51 porteurs sains des bacilles de Lœffler à des insufflations biquotidiennes de sérum antiméningococcique pulvérisé, pratiquées comme les insufflations de poudre de sérum antidiphtérique.

Cette seule expérience ne nous apprit pas la cause de l'échec de M. Nolf, vraisemblablement dû à la pulvérulence insuffisante de la poudre dont il s'est servi, mais elle aboutit à ce résultat paradoxal : le sérum antiméningococcique stérilisa plus rapidement les porteurs de bacilles de Lœffler que le sérum antidiphtérique.

En effet, des 28 diphtériques soignés par les insufflations de sérum antiméningococcique, 26 furent débarrassés de leurs germes en moins de 40 jours (tableau VI).

TABLEAU VI. — **Stérilisation du rhino-pharynx par insufflation de poudre de sérum antiméningococcique. Diphtéries aiguës.**

	NOMBRE DE DIPHTÉRIQUES DÉBARRASSÉS DE LEURS GERMES :				
	avant le 10e jour : 5	du 10e au 20e jour : 8	du 20e au 30e jour : 9	du 30e au 40e jour : 4	
Nombre de jours au bout desquels les différents diphtériques ont été débarrassés de leurs germes :	9	20	23	36	2 convalescents de diphtérie ont été évacués avant la stérilisation de leur rhino-pharynx, après 108 et 117 jours de traitement.
	7	11	30	38	
	6	12	23	31	
	8	11	22	39	
	7	14	30		
		20	27		
		12	21		
		19	27		
			25		

Cinq d'entre eux furent stérilisés avant le 10e jour;
Huit, du 10e au 20e jour;
Neuf, du 20e au 30e jour;
Quatre, du 30e au 40e jour.

Le sérum antiméningococcique pulvérisé débarrassa ces diphtériques normaux de leurs germes, en un temps moyen de *20,3 jours*.

Deux diphtériques, anormalement résistants, que nous dûmes évacuer encore porteurs de germes, après 108 et 117 jours de traitement, élèvent le temps moyen global à un minimum de *26,9 jours*.

Des 51 porteurs sains de bacilles de Lœffler, 49 furent stérilisés en moins de 50 jours (tableau VII).

TABLEAU VII. — **Stérilisation du rhino-pharynx par insufflation de poudre de sérum antiméningococcique. Porteurs sains de germes diphtériques.**

	NOMBRE DE PORTEURS SAINS DE GERMES STÉRILISÉS :						
	avant le 10e jour : 20	du 10e au 20e jour : 18	du 20e au 30e jour : 5	du 30e au 40e jour : 4	du 40e au 50e jour : 2	du 50e au 60e jour : 1	du 120e au 130e jour : 1
Nombre de jours au bout desquels les différents porteurs de germes ont été stérilisés :	5	11	21	33	41	59	128
	5	17	24	39	41		
	6	11	24	40			
	6	17	21	38			
	6	18	28				
	6	18					
	6	13					
	6	20					
	7	17					
	7	18					
	7	17					
	7	20					
	7	20					
	7	12					
	7	12					
	7	14					
	7	13					
	7	12					
	7						
	7						

Vingt d'entre eux virent leurs germes disparaître avant le 10ᵉ jour;

Dix-huit, du 10ᵉ au 20ᵉ jour;

Cinq, du 20ᵉ au 30ᵉ jour;

Quatre, du 30ᵉ au 40ᵉ jour;

Deux, du 40ᵉ au 50ᵉ jour.

Ces porteurs sains de germes, normaux, furent stérilisés après un temps moyen de *15,6 jours*.

Deux porteurs sains de bacilles de Lœffler, plus rebelles au traitement, ne furent débarrassés de leurs germes qu'après 59 et 128 jours : ils élèvent le temps moyen global à *18,6 jours*.

Il est probable que, toutes choses étant égales, le sérum antiméningococcique pulvérisé eût stérilisé les porteurs de bacilles de Lœffler aussi rapidement que la poudre de sérum antidiphtérique. S'il nous a paru un peu plus actif que cette dernière, c'est que nous l'avons appliqué pendant la belle période de l'année, tandis que nous avons surtout employé le sérum antidiphtérique pendant les mois d'automne et d'hiver. Nous avons pu nous rendre compte de cette influence saisonnière, en groupant les résultats obtenus par la méthode antiseptique, d'après les mois durant lesquels nos porteurs de germes avaient été soignés : d'août 1915 à février 1916, la méthode antiseptique a débarrassé les diphtériques de leurs germes, en un temps moyen normal de *36,7 jours*, les porteurs sains de bacilles de Lœffler en un temps moyen normal de *43,7 jours*; de février 1916 à août 1916, le traitement restant le même, ces moyennes tombèrent respectivement à *32,1* et à *40 jours*.

En résumé, les insufflations de sérum antiméningococcique pulvérisé stérilisent aussi rapidement les porteurs de bacilles de Lœffler, malades, convalescents ou sains, que les insufflations de poudre de sérum antidiphtérique.

Ces deux méthodes de traitement des porteurs de germes diphtériques sont nettement supérieures à la méthode antiseptique.

La supériorité de la méthode Martin sur le traitement par les antiseptiques ne peut donc être attribuée à une action spé-

cifique du sérum antidiphtérique antimicrobien, due à la sensibilisatrice qu'il contient.

Les sérums pulvérisés agissent-ils simplement de façon mécanique, à la manière d'une poudre inerte, en irritant les muqueuses, en les hyperémiant et en provoquant ainsi un appel de phagocytes à leur surface?

Augmentent-ils la défense de l'organisme en modifiant localement, par les molécules étrangères qu'ils apportent, l'équilibre colloïdal des humeurs?

Des recherches ultérieures l'établiront peut-être.

Quoi qu'il en soit, retenons surtout de nos résultats que les insufflations nasales et pharyngées de poudre de sérum sont actuellement le meilleur traitement dont nous disposions pour débarrasser rapidement de leurs germes les porteurs de bacilles diphtériques.

Août 1917.

BIBLIOGRAPHIE

R. Bénard. — Les porteurs de bacilles diphtériques. Leur traitement par les insufflations de poudre de sérum antimicrobien. *Presse médicale*, 1917, nº 27, p. 275-276.

M. Labbé et G. Canat. — Le traitement des porteurs de bacilles diphtériques. *Paris médical*, 1917, nº 1, p. 9-10.

E. Mosny. — Les enseignements d'une épidémie. Prophylaxie scolaire de la diphtérie. *Revue d'hygiène et de police sanitaire*, 1917, nº 2, p. 126-160.

P. Ravaut et P. Magne. — Le traitement local de la diphtérie. *Archives de médecine et de pharmacie militaires*, 1915, 8 p.

Sobernheim. — Epidemiologie und Prophylaxie der Diphterie, *Centralblatt für Bakteriologie*, 1913, p. 36, cit. *in* M. Meunier : Les notions nouvelles sur la diphtérie. *Revue d'hygiène et de police sanitaire*, 1913, nº 11, p. 1229-1242

ÉTUDES
SUR LE BACILLE D'EBERTH
ET LES BACILLES PARATYPHIQUES

(QUATRIÈME MÉMOIRE)

VIRULENCE DE NOMBREUX ÉCHANTILLONS

par M. NICOLLE, Mlle A. RAPHAEL et E. DEBAINS.

Nous interromprons, momentanément, la suite des mémoires consacrés aux caractères antigènes du bacille d'Eberth et des bacilles paratyphiques, pour faire connaître une première série d'expériences, concernant la virulence de ces germes.

Afin d'apprécier nettement les résultats de nos recherches (actuelles et ultérieures), il convient de bien s'entendre sur le sens des trois expressions : *pouvoir pathogène*, *pouvoir toxigène*, *virulence*.

Tout microbe est pathogène, lorsqu'il se montre capable d'engendrer des troubles morbides — *rien de plus*.

Tout microbe est toxigène, lorsqu'il sécrète un poison spécifique.

Tout microbe est virulent, lorsqu'il se multiplie dans l'organisme attaqué et l'envahit plus ou moins vite et plus ou moins complètement.

En dernière analyse, les microbes ne sont guère pathogènes que parce qu'ils empoisonnent l'économie. *Mais* le degré de leur pouvoir toxigène et l'activité des poisons fournis, d'une part, l'absence, la présence, l'intensité de la virulence, d'autre part, interviennent d'une façon *essentielle* et dans le mécanisme des maladies microbiennes et dans leur traitement. Rappelons quelques faits typiques.

Le *bacillus botulinus* sécrète sa toxine au sein de divers aliments; ceux-ci deviennent « vénéneux » et peuvent alors tuer l'homme (ainsi que les animaux), dont les tissus vivants ne

permettent pas, cependant, le développement du microbe de van Ermengem. — *Donc* : pouvoir pathogène élevé, dû à un pouvoir toxigène élevé ; absence de virulence ; maladie correspondante toxique ; thérapeutique antitoxique.

Le vibrion septique et le *bacterium Chauvoei* (seul et même organisme, selon nous) peuvent sécréter leur poison *in vivo*, mais ils disparaîtraient rapidement de l'organisme et demeureraient inoffensifs si ce poison ne possédait pas une faculté nécrosante très marquée. C'est dans les tissus nécrosés (partant, dans la matière morte) que se cultivent les germes et leur développement reste intimement lié à la mortification préalable des éléments anatomiques. — *Donc* : pouvoir pathogène élevé, dû, ici encore, à un pouvoir toxigène élevé (Roux) ; absence de virulence ; maladie correspondante toxique ; thérapeutique antitoxique (M. Nicolle, E. Cesari et M[lle] A. Raphaël).

Le bacille tétanique, incapable de persister *in vivo*, ne devient dangereux que par les conditions de culture que lui créent et le traumatisme et les germes associés (Roux, Vaillard) : double source de nécrose.

Le bacille diphtérique semble posséder une certaine « virulence de surface », mais la mortification des parties atteintes, sous l'influence du poison spécifique, doit jouer le rôle dominant, puisque la thérapeutique antitoxique arrête le développement des fausses membranes.

Le bacille de Preisz-Nocard se montre à la fois très virulent et très toxique. C'est la virulence qui représente incontestablement le facteur essentiel, comme on peut le prouver en deux mots. Le sérum des chevaux atteints de lymphangite ulcéreuse possède un haut pouvoir antitoxique (M. Nicolle, Loiseau, Forgeot et Cesari). Or, cette curieuse propriété n'empêche pas le progrès des lésions caractéristiques, alors que la bactériothérapie amène sans difficulté leur rétrocession (Truche).

Passons, pour abréger, aux microbes qui déterminent une septicémie rapide chez le lapin et la souris (tel, le pneumocoque). Ici, la virulence atteint son maximum et « gouverne » toute l'évolution des accidents. La fonction toxigène demeure très réduite pour chaque germe envisagé individuellement et ne constitue un péril que par suite de l'abondance incroyable

des individus, c'est-à-dire par suite de l'extrême multiplication *in vivo* du pneumocoque (résultat de son extrême virulence). — *D'où*, thérapeutique uniquement antimicrobienne (Neufeld, Flexner, Truche).

Nous nous contenterons de ces quelques exemples. Ils légitiment notre distinction, simple et précise, entre le pouvoir toxigène et la virulence; caractères absolument indépendants, souvent même divergents chez un microbe donné.

Rien de plus facile que d'établir la *généralité des notions précédentes*. Pour cela, modifions doublement notre point de vue et « sautons » des maladies *bactériennes* des *animaux* aux maladies *cryptogamiques* des *plantes*. Voici ce que nous apprennent les auteurs (quand on se donne la peine de grouper leurs travaux et d'en comparer les résultats).

Certains champignons envahissent plus ou moins profondément les tissus végétaux et détruisent ces tissus comme conséquence de leur développement *in vivo*. Dans la règle, il s'agit de nécrose, tantôt sèche, tantôt humide, selon la richesse en eau des organes atteints et l'état de l'atmosphère. On a souvent noté que le parasite « émigre » des parties malades vers les parties encore saines, disparaissant ainsi des premières lorsqu'elles sont totalement désintégrées. De tels champignons offrent les stigmates caractéristiques des organismes virulents.

D'autres cryptogames ne se développent dans les tissus qu'après les avoir tués. Le plus bel exemple est fourni par la *sclerotinia Libertiana*. Nous empruntons à de Bary les faits suivants. Le parasite, déposé sur une jeune tige (fève), s'y multiplie contre les cellules épidermiques, auxquelles ses crampons le maintiennent fixé. Il sécrète un poison très actif, qui nécrose l'épiderme, puis le parenchyme cortical. *Alors seulement*, il peut envahir les tissus mortifiés et se cultiver abondamment, déterminant la nécrose des parties plus profondes. Et ainsi de suite, jusqu'à ce que la plante meure. La *sclerotinia Libertiana* apparaît douée d'un haut pouvoir toxigène et totalement dépourvue de virulence.

Ces notions nécessaires étant établies, nous allons rapporter une première série d'expériences, concernant la *virulence* du bacille d'Eberth et des bacilles paratyphiques. Leur *propriété*

toxigène sera simplement mentionnée, là où elle se manifeste au premier plan. Indépendante de la virulence, comme il vient d'être dit, elle réclame des études spéciales et détaillées, qui viendront ultérieurement.

Nos recherches ont porté sur les lapins (animaux de 2.000 gr.), les cobayes (mâles — 500-600 gr.) et les souris (20 gr.). On injectait (doses très variables) des cultures en bouillon-Martin glucosé (0,2 p. 100), âgées de 24 heures et développées à 37°.

Nous envisagerons, successivement : les *résultats* de nos expériences (*échantillons normaux*) et les *résultats* de nos expériences (*échantillons anormaux*); puis, nous présenterons quelques *conclusions générales*.

Sous le nom d'échantillons normaux ou anormaux, nous entendons les spécimens, typiques ou non, *quant à leurs caractères biologiques* (voir notre premier mémoire). Un certain nombre d'échantillons normaux, étudiés ici, ne figurent pas dans nos travaux antérieurs.

RÉSULTATS DE NOS EXPÉRIENCES (ÉCHANTILLONS NORMAUX

BACILLE PARATYPHIQUE B

Expériences sur les cobayes.

Injections sous-cutanées.

Vingt-cinq échantillons; dose uniforme : 1 cent. cube. — Tous les germes engendrent une lésion locale; 5 seulement amènent la mort (3-10 jours). Les sujets, encore en vie 12 jours après l'inoculation, ont été sacrifiés et étudiés au point de vue anatomo-pathologique et bactériologique.

Symptômes. — Émaciation nulle ou très variable. Localement : tantôt bourbillon, s'ouvrant soit par usure lente de la peau, soit par escarre secondaire; tantôt escarre primitive, suivie de bourbillon. L'escarre primitive revêt généralement le type V (mode mineur de la nécrose humide; V tache violette), rarement le type franchement humide, parfois une forme intermédiaire.

Lésions (*internes*). — Rate hypertrophiée. Nécroses et abcès du foie assez communs. Bile ordinairement purulente. Parfois, péricardite suppurée.

Examen bactériologique. — Persistance habituelle des germes *loco læso.* Dans la moitié des cas environ, cultures négatives avec le sang du cœur, la rate et la bile; dans l'autre moitié, cultures souvent positives avec le sang et la rate, presque toujours avec la bile.

Conclusions. — Le bacille paratyphique B persiste volontiers au point inoculé; il y détermine constamment (fût-ce avant de disparaître) la production d'un exsudat, qu'il nécrose ensuite. Il peut envahir l'organisme, demeurer en circulation, infecter les viscères, s'installer dans la bile. Les abcès du foie, l'état purulent de la bile et des épanchements péricardiques éventuels, attestent son caractère pyogène; les nécroses hépatiques, son caractère toxique, dont la plus haute expression se manifeste par la mort, parfois rapide, des sujets inoculés. — Donc : *virulence très nette, dans un certain nombre de cas.*

Injections intraveineuses.

Trois échantillons; le 1er tue à 10^{-1} cent. cube, le 2e à 10^{-2}, le 3e à 10^{-2} et parfois à 10^{-3}. Mort en 3 à 18 jours. Les sujets survivants ont été sacrifiés 2 mois à 2 mois et demi après l'inoculation.

Symptômes. — Émaciation, agonie longue (pouvant durer 3 jours), quand les animaux succombent tardivement.

Lésions (internes). — Bile souvent purulente; péricardite (suppurée) rare.

Examen bactériologique. — *Sujets morts « spontanément ».* Dans un tiers des cas environ, cultures positives avec le sang; dans presque tous les cas, avec la rate et la bile; une fois, avec l'urine. — *Animaux sacrifiés.* — Présence des germes, une seule fois, dans la rate.

Conclusions. — Le bacille paratyphique B, introduit par la voie veineuse (dose bien plus faible que tout à l'heure), demeure au maximum 5 jours dans le sang; il persiste longtemps dans la bile et dans la rate (parfois même très longtemps dans cette dernière). — Donc : *virulence incontestable.* Notons (sans l'expliquer) que la péricardite suppurée se montre beaucoup moins fréquente ici que lors d'injection sous-cutanée.

Injections intratesticulaires.

Dix échantillons. Tous engendrent une lésion locale. Les uns tuent à 10^{-1} cent. cube, les autres à 10^{-2}, d'autres à 10^{-3}; la terminaison fatale (1-10 jours) dépend de la dose et de l'échantillon. Les sujets survivants ont été sacrifiés 14 jours à 5 mois après l'inoculation.

Symptômes. — Émaciation variable. Lors des cas mortels, agonie parfois très longue. — Localement. Tuméfaction du testicule, qui atteint volontiers la grosseur d'une noix et se fixe dans le scrotum ou l'abdomen. Quand l'animal doit guérir, l'organe redevient mobile après quelques jours et s'atrophie progressivement en s'indurant. Jamais on n'observe d'ouverture, malgré le ramollissement des parties et la distension de la peau. — Complications : péritonite (sensibilité extrême du ventre); périostique du sternum (observée 1 fois — a guéri); paraplégie flasque (observée 1 fois — a guéri).

Lésions (*internes*). — Suivant les cas, on note, au niveau du testicule, de la congestion, de la nécrose ou de l'atrophie. Mentionnons encore : la funiculite, la spermocystite, la cystite — et même de légères altérations du testicule non inoculé. La péritonite n'est pas rare, en l'absence de toute rupture de la glande mâle. On rencontre aussi des abcès du rein, de la péricardite suppurée, des nécroses hépatiques. La bile ne se montre pas habituellement purulente.

Examen bactériologique. — *Sujets morts « spontanément ».* Présence constante des germes dans le sang, la rate et la bile. — *Sujets sacrifiés.* Seule, la bile peut contenir des microbes, mais elle peut en contenir 26 jours après l'inoculation.

Conclusions. — Le bacille paratyphique B détermine toujours une lésion locale, tantôt nécrotique, tantôt « inflammatoire » et atrophiante. Il persiste longtemps dans le sang et la rate, plus longtemps encore dans la bile. Il manifeste son pouvoir pyogène par des suppurations variées et sa toxicité par les nécroses et par la mort. *Sa virulence éclate nettement* ici. Son pouvoir envahissant, que favorise sans conteste la culture intratesticulaire, dépasse de beaucoup celui que nous ont révélé les injections sous-cutanées.

EXPÉRIENCES SUR LES LAPINS.

Injections sous-cutanées.

Vingt-deux échantillons; dose uniforme : 1 cent. cube. Tous les germes engendrent une lésion locale; 2 fois seulement la mort est survenue (en 9 jours). Les animaux survivants ont été sacrifiés 12 jours après l'inoculation.

Symptômes. — Émaciation inconstante; parfois, diarrhée. Localement : comme chez le cobaye, mais complications infectieuses fréquentes.

Lésions (internes). — Rarement, hypertrophie de la rate et nécroses du foie.

Examen bactériologique. — Persistance habituelle des germes *loco læso.* Une seule fois, cultures positives avec le sang, la rate et la bile.

Conclusions. — Dans la règle, les microbes demeurent au point inoculé, sans tendance à l'envahissement. Ils peuvent cependant tuer (par intoxication), lorsqu'il s'agit de sujets particulièrement sensibles.

Injections intraveineuses.

Six échantillons. La mort survient, le plus souvent, avec 10^{-1} cent. cube (1-60 jours); avec 10^{-2} elle n'a jamais lieu, mais les germes persistent éventuellement dans l'économie. Les sujets survivants ont été sacrifiés 20 jours à 4 mois après l'inoculation.

Symptômes. — Émaciation; diarrhée. Nous avons observé 3 fois de la paraplégie spasmodique (guérissant ou aboutissant à la mort).

Voici comment se présentent ces troubles nerveux : talon surélevé et déjeté en dehors; atrophie du train postérieur; incontinence des matières; parfois alopécie de la paroi abdominale.

Lésions (internes). — Habituellement : abcès du foie et du rein, nécroses hépatiques. Bile d'ordinaire purulente; parfois

vésicule hypertrophiée, avec parfois épaissies (aspect de gros intestin). Chez un sujet, abcès miliaires de l'appendice (bacille paratyphique B au sein des lésions).

Examen bactériologique. — *Sujets morts « spontanément ».* Pour la moitié des cas, culture positive avec le sang; pour presque tous les cas, avec la rate et la bile; jamais, avec l'urine. — *Sujets sacrifiés.* Présence des germes, dans la bile seule, chez les 2/3 des animaux environ. La bile peut se montrer infectée 3 mois et demi après l'inoculation.

Conclusions. — Le bacille paratyphique B, introduit par la voie veineuse (dose plus faible que tout à l'heure), demeure peu de jours dans le sang; il persiste longtemps dans la rate et la bile (parfois même très longtemps dans cette dernière). Il peut déterminer : des suppurations viscérales; une violente cholécystite; des lésions toxiques du foie; enfin, un empoisonnement mortel, à marche plus ou moins rapide. *Sa virulence se montre en pleine lumière.* — Nous ignorons le mécanisme de la paraplégie spasmodique, signalée plus haut.

Expériences sur les souris (injections sous-cutanées).

Huit échantillons. Les uns tuent à 10^{-1} cent. cube, les autres à 10^{-2}... 10^{-8}.

Pas de symptômes spéciaux (immobilité, yeux collés, poil piqué, refroidissement...) Mort plus ou moins rapide (1 jour-6 semaines). — *Post obitum* : abcès du foie, bile purulente. — Germes parfois très abondants dans le sang (visibles au microscope). — *Donc* : le bacille paratyphique B se montre *très virulent* pour la souris, chez laquelle il peut déterminer une véritable septicémie.

BACILLE PARATYPHIQUE A

Expériences sur les cobayes.

Injections sous-cutanées.

Dix échantillons; dose uniforme : 1 cent. cube. Lésion locale inconstante; jamais de terminaison mortelle. Tous les animaux ont été sacrifiés 12 jours après l'inoculation.

Symptômes. — Émaciation nulle ou peu marquée. Localement, tantôt simple empâtement transitoire (c'est-à-dire à réaction quasi nulle); tantôt bourbillon, ouvert soit par usure de la peau soit par escarre secondaire; tantôt escarre primitive du type V, suivie de bourbillon. Lésions locales moins étendues que celles qui suivent l'injection du bacille paratyphique B.

Lésions (internes). — Font constamment défaut.

Examen bactériologique. — Persistance des germes, *loco læso*, chez la moitié des sujets. Présence, une seule fois, dans la bile.

Conclusions. — Le bacille paratyphique A peut disparaître du tissu cellulaire avant d'avoir déterminé des altérations sérieuses. Il n'envahit point réellement l'organisme du cobaye, car sa présence dans la bile seule (et non altérée) demeure exceptionnelle. — *Donc : pas de virulence*, chez le cobaye inoculé sous la peau.

Injections intraveineuses.

Trois échantillons; dose uniforme : 10^{-1} cent. cube. Jamais de terminaison mortelle. Tous les animaux ont été sacrifiés 1 mois et demi à 2 mois après l'inoculation.

Symptômes. — Emaciation transitoire. Mentionnons le développement d'*accidents nerveux*, observés une seule fois.

Voici le détail des faits. 8 jours après l'injection, parésie du train postérieur, avec tremblement de la patte gauche. Puis : paraplégie, diarrhée, escarre de la face externe de la patte gauche, coïncidant avec la chute des poils de ce membre. Enfin : cicatrisation de l'ulcus d'origine nécrotique, régénération des poils, guérison de la paraplégie, mais persistance d'une atrophie musculaire de la patte.

Lésions (internes). — Nulles.

Examen bactériologique. — Négatif.

Conclusion. — Pas de virulence appréciable. Accidents nerveux possibles, dont le mécanisme demeure inconnu.

Injections intratesticulaires.

Six échantillons; dose uniforme : 10^{-1} cent. cube. Jamais de terminaison mortelle. Tous les animaux ont été sacrifiés 2 mois après l'inoculation.

Symptômes. — Émaciation légère. Hypertrophie testiculaire inconstante, mais fatalement suivie d'atrophie, quand elle survient.

Lésions (internes). — Pas de nécrose de la glande génitale.

Examen bactériologique. — Présence des germes, une seule fois, dans l'urine.

Conclusions. — Persistance habituellement peu prolongée *loco læso*; suffisante, cependant, pour amener, chez certains sujets, l'atrophie de l'organe inoculé. Envahissement (par continuité) exceptionnel et limité à la vessie. — *Donc : pas de virulence* réelle.

EXPÉRIENCES SUR LES LAPINS.

Injections sous-cutanées.

Dix échantillons; dose uniforme : 1 cent. cube. Lésion locale inconstante; terminaison mortelle dans 2 cas seulement (7 jours). Les animaux survivants ont été sacrifiés 12 jours après l'inoculation.

Symptômes. — Émaciation nulle ou très variable; une fois, conjonctivite. Localement : tantôt empâtement transitoire; tantôt bourbillon, ouvert par usure de la peau; tantôt escarre primitive du type V, suivie de bourbillon.

Lésions (internes). — Quelquefois atrophie de la rate.

Examen bactériologique. — Persistance locale des germes, rare; absence au loin, constante.

Conclusions. — *Disparition rapide au point inoculé*; *jamais d'envahissement* (on n'a pu déterminer la nature de la conjonctivite observée chez un seul animal). Mort possible (par intoxication), pour des sujets exceptionnellement sensibles.

Injections intraveineuses.

Sept échantillons. 4 tuent régulièrement au centimètre cube, irrégulièrement à 10^{-1}. Les sujets survivants ont été sacrifiés 2 mois après l'inoculation.

Symptômes. — On observe : tantôt des accidents suraigus (suivis d'une mort plus ou moins rapide), tantôt des troubles d'allure lente, soit mortels, soit curables.

Accidents suraigus. Une heure environ après l'injection, polypnée, état parétique, cris; mort (rare) ou sédation des symptômes. Dans ce dernier cas : émaciation croissante, diarrhée, terminaison fatale en 3-9 jours.

Phénomènes lents. — Émaciation progressive ou transitoire, diarrhée habituelle, mort (6-39 jours) ou guérison.

Lésions (internes). — Cas suraigus : rien de spécial. Cas lents : parfois hypertrophie et épaississement de la vésicule biliaire; généralement, bile épaisse et blanchâtre.

Examen bactériologique. — Cultures toujours négatives avec le sang. Cultures positives : 1 fois avec la rate, 1 fois avec l'urine, 4 fois avec la bile (où les germes peuvent se conserver jusqu'à 2 mois).

Conclusions. — Les accidents suraigus (qui ne s'observent que si l'on a injecté un centimètre cube de microbes) révèlent une intoxication brutale; les phénomènes lents, un empoisonnement progressif. Les germes disparaissent rapidement du sang et des viscères. Dans la bile seule, ils peuvent demeurer longtemps. Tout indique l'*absence de réelle virulence* du bacille paratyphique A, mais aussi sa notable toxicité.

EXPÉRIENCES SUR LES SOURIS (INJECTIONS SOUS-CUTANÉES).

Quinze échantillons. Les uns peuvent tuer à $5\text{-}10^{-1}$ cent. cube, les autres à 10^{-1} (généralement avec infection surajoutée), deux demeurent inactifs. Mort plus ou moins rapide (1-45 jours). Chez les animaux survivants, sacrifiés après deux mois, l'organisme se montre stérile.

Rien de spécial *intra vitam* et *post obitum*. — Cultures positives avec le sang, dans plus de la moitié des cas, mais absence de germes au microscope. *Chez la plupart des sujets qui meurent d'infection surajoutée, celle-ci est due au bacille paratyphique B. — Donc : le bacille paratyphique A apparaît bien moins virulent que le bacille paratyphique B.*

Le bacille paratyphique A n'est pas le seul microbe qui puisse « faire sortir » le bacille paratyphique B, hôte éventuel de la souris; parmi les autres

bactéries, jouissant de la même faculté, citons le pneumocoque. Rappelons aussi que des virus filtrants (fièvre jaune, peste porcine) « font sortir », avec une fréquence bien connue, le bacille paratyphique B, chez l'homme et le porc.

BACILLE TYPHIQUE

Expériences sur les cobayes.

Injections sous-cutanées.

Vingt-deux échantillons; dose uniforme : 1 cent. cube. — Lésion locale constante, mais pas de terminaison mortelle. Tous les animaux ont été sacrifiés 12 jours après l'inoculation

Symptômes. — Émaciation nulle ou très variable. Localement : tantôt bourbillon, s'ouvrant soit par usure de la peau, soit par escarre secondaire ; tantôt escarre primitive du type V, suivie de bourbillon. Lésions locales habituellement moins étendues que celles qui suivent l'injection du bacille paratyphique B.

Lésions (*internes*). — Parfois, rate hypertrophiée.

Examen bactériologique. — Persistance fréquente, *loco læso.* Présence, une fois dans la rate et une fois dans la bile.

Conclusions. — Le bacille typhique *se comporte*, pratiquement, *comme le bacille paratyphique A*. Il disparaît, cependant, un peu moins facilement de l'organisme.

Injections intraveineuses.

Trois échantillons; dose uniforme : 10^{-1} cent. cube. Jamais de terminaison mortelle. Tous les animaux ont été sacrifiés 2 mois après l'inoculation.

Symptômes. — Émaciation faible et transitoire.

Lésions (*internes*). — Nulles.

Examen bactériologique. — Négatif.

Conclusions. — *Pas de virulence* appréciable.

Injections intratesticulaires.

Quatre échantillons; dose uniforme : 10^{-1} cent. cube. — Mort inconstante, avec 2 échantillons. Tous les animaux survivants ont été sacrifiés 2 mois après l'inoculation.

Symptômes. — Émaciation habituellement faible et transitoire. Localement. Tuméfaction du testicule, fixation, puis retour de la mobilité et atrophie. Une seule fois, nécrose (ouverture, suivie de guérison). Pas de complications.

Lésions (internes). — Nulles.

Examen bactériologique. — Négatif.

Conclusions. — Comme pour le bacille paratyphique A. *Pas de virulence réelle.*

Expériences sur les lapins.

Injections sous-cutanées.

Vingt-deux échantillons; dose uniforme : 1 cent. cube. — Lésion locale constante ; terminaison mortelle dans 3 cas (5, 6 et 10 jours). Les animaux survivants ont été sacrifiés 12 jours après l'inoculation.

Symptômes. — Émaciation, souvent très marquée. Localement : comme chez le cobaye.

Lésions (internes). — Une fois, atrophie des viscères.

Examen bactériologique. — On trouve, dans certains cas, les germes *loco læso* ; ils font toujours défaut ailleurs.

Conclusions. — Comme pour le bacille paratyphique A.

Injections intraveineuses.

Neuf échantillons. Un seul tue (au cent. cube). Les animaux survivants ont été sacrifiés 1 mois à 3 mois et demi après l'inoculation.

Symptômes. — Émaciation nulle ou très variable. Deux fois conjonctivite, deux fois paraplégie spasmodique légère.

Lésions (*internes*). — Nulles.

Examen bactériologique. — Cultures positives avec la rate et la bile, chez un animal mort « spontanément » — et avec la bile, chez un animal sacrifié après 1 mois.

Conclusions. — *Pas de virulence* appréciable. Nature de la conjonctivite, inconnue (rappelons que la conjonctivite a été signalée, plus haut, chez un lapin qui avait reçu du bacille paratyphique A sous la peau). De même, pour la nature de la paraplégie spasmodique (signalée, plus haut, chez 3 lapins qui avaient reçu du bacille paratyphique B dans les veines).

Expériences sur les souris (injections sous-cutanées).

Trente échantillons. 6 tuent irrégulièrement à 5.10^{-1} cent. cube, 9 régulièrement (mais pas à 10^{-1}), 1 régulièrement à 10^{-1}, 14 demeurent inactifs. Mort plus ou moins rapide (1-28 jours). Chez les animaux survivants, sacrifiés après 1 mois et demi, l'organisme se montre stérile.

Rien de spécial *intra vitam*; abcès du foie, à l'autopsie, chez un sujet. — Le sang ne fournit pas toujours de cultures positives, quand les animaux meurent en 24 heures ; il n'en fournit jamais quand ils succombent après 2 jours.

Donc : *le bacille typhique apparaît bien moins virulent que le bacille paratyphique B.*

RÉSUMÉ

Caractères du bacille paratyphique B.

Cobaye. — Un certain nombre d'échantillons sont virulents pour cette espèce animale : leur nombre croît (en dépit de la diminution des doses), lorsqu'on passe de l'inoculation sous-cutanée à l'inoculation intratesticulaire ou intraveineuse, plus sévères. — Le bacille paratyphique B détermine toujours des lésions locales : escarotiques sous la peau, escarotiques ou « inflammatoires » (suivies d'atrophie), dans le testicule. Introduit par la voie vasculaire, il infecte les viscères, occasionne des suppurations internes variées, des nécroses hépatiques et

peut tuer rapidement en empoisonnant l'organisme. Introduit sous la peau ou dans le testicule, il provoque les mêmes accidents internes, mais moins souvent et à plus forte dose. Enfin, il se cantonne volontiers dans la bile.

Lapin. — La virulence se manifeste uniquement lors d'injection intraveineuse (mêmes effets que chez le cobaye). Sous la peau, simple lésion locale, sans envahissement de l'économie.

Souris (sous la peau). — Virulence *très* marquée, habituellement véritable septicémie.

Caractères du bacille paratyphique A.

Cobaye. — Absence de virulence; disparition rapide. Lésions locales inconstantes; dans le testicule, pas de nécrose, mais atrophie possible.

Lapin. — Absence de tout développement au sein de l'organisme. Lésion locale (sous la peau) inconstante. Toxicité marquée, surtout lors d'injection intraveineuse.

Souris (sous la peau). — Virulence, mais très inférieure à celle du bacille paratyphique B.

Caractères du bacille typhique.

Cobaye. — Absence de virulence. Lésions locales constantes; dans le testicule, nécrose exceptionnelle, mais atrophie. Les germes disparaissent moins vite que les bacilles paratyphiques A.

Lapin. — Absence de tout développement au sein de l'organisme. Lésion locale (sous la peau) constante. Les germes disparaissent moins vite que les bacilles paratyphiques A. Toxicité, surtout lors des injections intraveineuses, mais moindre que celles des bacilles paratyphiques A.

Souris (sous la peau). — Comme le bacille paratyphique A.

Remarque. — Les bacilles paratyphique A et typhique peuvent, exceptionnellement, envahir (avec discrétion) l'organisme du cobaye inoculé sous la peau et y persister un certain temps (on a trouvé — voir plus haut — le bacille paratyphique A une fois dans la bile et le bacille typhique une fois dans la bile et une fois dans la rate). — Ces mêmes germes, introduits par la voie sanguine chez le lapin, peuvent demeurer un certain temps *in vivo* (on a

trouvé le bacille paratyphique A une fois dans l'urine, une fois dans la rate et quatre fois dans la bile — et le bacille typhique une fois dans la rate et deux fois dans la bile). Ébauches de virulence, sans signification pratique, mais intéressantes au point de vue théorique, car elles réalisent, sous forme rare et atténuée, chez l'animal, ce que l'on observe, fréquemment et en grand, chez l'homme.

Parallèle de nos recherches et de celles des auteurs.

D'une façon générale, nous croyons nos recherches plus complètes et nos descriptions plus précises. On ne trouve aucun renseignement, dans les livres, sur les injections intraveineuses et intratesticulaires des trois germes, chez le cobaye. D'autre part, les symptômes et lésions, déterminés par ces germes chez le cobaye, le lapin et la souris, sont insuffisamment relatés et les examens bactériologiques demeurent souvent incomplets.

D'une façon particulière, l'étude expérimentale du bacille paratyphique A doit être considérée comme inexistante jusqu'ici. Pour ce qui concerne le bacille d'Eberth et le bacille paratyphique B, nous pouvons faire les remarques suivantes.

Inoculations sous-cutanées, chez le cobaye (bacille typhique et bacille paratyphique B). — Nous sommes d'accord avec les auteurs.

Inoculations sous-cutanées, chez le lapin. — *Bacille typhique.* Nous sommes d'accord avec les auteurs. — *Bacille paratyphique B.* Quelques auteurs ont eu, entre les mains, des échantillons plus virulents que les nôtres; la majorité a observé les mêmes réactions que nous.

Inoculations intraveineuses, chez le lapin. — *Bacille typhique.* Certains auteurs ont eu, entre les mains, des échantillons qui persistaient plus volontiers que les nôtres dans le sang et la bile. — *Bacille paratyphique B.* Nous sommes d'accord avec les auteurs (dont les descriptions demeurent bien sommaires).

Inoculations sous-cutanées, chez la souris (bacille typhique et bacille paratyphique B). — Nous sommes d'accord avec les auteurs.

Valeur de l'élément virulence, dans le diagnostic du bacille d'Eberth et des bacilles paratyphiques.

Si l'élément virulence ne permet pas de distinguer entre eux les bacilles typhique et paratyphiques, il permet, par contre,

d'établir deux groupes : bacille paratyphique B et « bacilles non-B » (bacille d'Eberth et bacille paratyphique A) — distinction incomplète, utile cependant.

Voici ce que montrent nos recherches. Tout bacille, actif sur le cobaye et le lapin, est un paratyphique B; tout bacille, tuant la souris de 10^{-2} à 10^{-8} cent. cube, également. Tout bacille, ne tuant la souris que sous un volume supérieur à 10^{-1} cent. cube, appartient aux « non-B ». Tout bacille, tuant à 10^{-1} cent. cube, demeure indéterminé. Ce dernier cas étant très rare, la division en deux groupes conserve sa valeur, limitée mais indéniable.

RÉSULTATS DE NOS EXPÉRIENCES (ÉCHANTILLONS ANORMAUX)

Plus de la moitié de nos échantillons anormaux (anormaux, on le sait, au point de vue des caractères biologiques), ont été inoculés sous la peau des souris. Nous avons choisi les souris, en raison du prix élevé des lapins et des cobayes et de la rareté de ces derniers. Le seul inconvénient (bien minime) de ce choix a consisté dans l'indétermination des résultats pour l'échantillon 39, qui ne saurait être étiqueté ni bacille paratyphique B, ni « non-B », d'après ce que nous venons de dire.

Le tableau ci-joint, où le diagnostic par l'inoculation chez la souris est mis en parallèle avec le diagnostic par l'agglutination, mène aux conclusions suivantes.

Pas de discordance (on ne saurait dire : concordance), pour les bacilles typhiques et les bacilles paratyphiques A.

Concordance, pour le bacille paratyphique B n° 29.

Indétermination, pour le bacille paratyphique B n° 34.

Caractère « non-B » de l'échantillon indéterminé 52.

Caractère paratyphique B des échantillons indéterminés 115 et 95.

Il *semble* donc bien qu'il n'y ait pas, dans la règle, discordance entre les caractères antigènes (agglutinabilité) et les caractères d'inoculation, pour nos échantillons anormaux; on ne saurait en dire davantage.

NUMÉRO DU GROUPE ET DE L'ÉCHANTILLON	DIAGNOSTIC par L'AGGLUTINATION	VIRULENCE POUR LA SOURIS INOCULÉE SOUS LA PEAU	DIAGNOSTIC par la VIRULENCE
Groupe I : Échantillon 39	B. typhique	+ inconstante, avec 5.10^{-1} c.c.	Non-B.
Groupe I : Échantillon 97	B. typhique	+ avec 5.10^{-1} c.c.	Non B.
Groupe II : Échantillon 32	Indéterminé	+ inconstante, avec 10^{-1} c.c.	Non-B.
Groupe II : Échantillon 124	B. typhique	+ inconstante, avec 10^{-1} c.c.	Non-B.
Groupe III : Échantillon 6	B. typhique	+ Inconstante, avec 5.10^{-1} c.c	Non B.
Groupe IV : Échantillon 7	B. paratyphique A.	Ne tue pas à 5.10^{-1} c.c.	Non-B.
Groupe IV : Échantillon 115	Indéterminé	+ avec 10^{-3} c.c.	B. paratyphique B.
Groupe V : Échantillon 126	B. paratyphique A.	+ avec 10^{-1} c.c.	Non-B.
Groupe V : Échantillon 129	B. paratyphique A.	+ inconstante, avec 10^{-1} c.c.	Non-B.
Groupe V : Échantillon 130	B. paratyphique A.	+ avec 5.10^{-1} c.c	Non-B.
Groupe V : Échantillon 134	B. paratyphique A.	+ inconstante, avec 10^{-1} c.c.	Non-B.
(Les 7 autres échantillons de ce groupe n'ont pas été étudiés.)			
Groupe VI : Échantillon 95	Indéterminé	+ avec 10^{-4} c.c. (et peut-être moins).	B. paratyphique B.
Groupe VII : Échantillon 34	B. paratyphique B.	+ avec 10^{-1} c.c.	Indéterminé.
(Les 2 autres échantillons de ce groupe n'ont pas été étudiés.)			
Groupe VIII : Échantillon 29	B. paratyphique B.	+ avec 10^{-2} c.c.	B. paratyphique B.
(Les 2 autres échantillons de ce groupe n'ont pas été étudiés.)			

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Chez l'homme, le bacille d'Eberth et les bacilles paratyphiques sont capables de déterminer des infections de même forme et d'égale intensité. Rien ne permet de les reconnaître dans leurs effets.

Chez les animaux étudiés par nous, certaines différences apparaissent nettement. Le bacille paratyphique B est virulent pour le cobaye, moins pour le lapin, beaucoup plus pour la souris — le bacille paratyphique A est avirulent pour le cobaye et le lapin, moins virulent que le bacille paratyphique B pour la souris — le bacille typhique se comporte comme le bacille paratyphique A.

L'observation anatomo-clinique des sujets inoculés montre, d'autre part, que le bacille paratyphique B est toxique, le bacille paratyphique A encore plus, le bacille typhique certainement moins. L'analyse de la faculté toxigène des trois germes devra fournir l'explication de ces différences.

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES

A L'INSTITUT PASTEUR EN 1917

par JULES VIALA, Préparateur au service antirabique.

Pendant l'année 1917, 1.549 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur de Paris : 10 sont mortes de la rage, soit une proportion brute de 0,64 p. 100.

Mais 4 personnes ont été prises de rage au cours du traitement; 2 personnes sont mortes moins de 15 jours après la fin du traitement (1); ces personnes doivent donc être défalquées.

Personnes traitées.	1.543
Morts de rage	4
Mortalité p. 100.	0,26

Le tableau ci-dessous indique les résultats des vaccinations depuis l'origine.

ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100	ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100
1886	2.671	25	0,94	1902	1.005	2	0,18
1887	2.770	14	0,79	1903	628	2	0,32
1888	1.622	9	0,55	1904	755	3	0,39
1889	1.830	7	0,38	1905	721	3	0,41
1890	1.540	5	0,32	1906	772	1	0,43
1891	1.559	4	0,25	1907	786	3	0,38
1892	1.790	4	0,22	1908	524	1	0,19
1893	1.648	6	0,36	1909	467	1	0,21
1894	1.387	7	0,50	1910	401	0	0,00
1895	1.520	5	0,38	1911	341	1	0,29
1896	1.308	4	0,30	1912	395	0	0,00
1897	1.529	6	0,39	1913	330	0	0,00
1898	1.465	3	0,20	1914	373	0	0,00
1899	1.614	4	0,25	1915	654	1	0,15
1900	1.420	4	0,28	1916	1.388	3	0,21
1901	1.321	5	0,38	1917	1.543	4	0,26

(1) D'après les expériences faites sur les chiens, on est autorisé à penser que les centres nerveux des personnes mortes de rage dans les 15 jours qui suivent le traitement ont été envahis par le virus rabique avant que la cure ait pu avoir toute son efficacité.

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories :

Catégorie A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Catégorie B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Catégorie C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition entre ces catégories des personnes traitées en 1917.

ANNÉE 1917	MORSURES à la tête			MORSURES aux mains			MORSURES aux membres			TOTAUX		
	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100
Catégorie A . .	20	0	0	66	1	1,51	130	0	0	216	1	0,46
Catégorie B . .	79	0	0	377	1	0,26	392	2	0,51	848	3	0,35
Catégorie C . .	30	0	0	213	0	0	236	0	0	479	0	0
	129	0	0	656	2	0,30	758	2	0,26	1.543	4	0,26

Au point de vue de leur nationalité les personnes traitées se répartissent de la façon suivante :

France	1.503
Belgique	35
Colonies anglaises.	5

Répartition par départements des 1.503 Français traités.

Ain.	1	Cantal	4
Aisne.	44	Charente	1
Allier.	9	Cher	18
Alpes-Maritimes	2	Côte-d'Or.	4
Aube	11	Corse.	2
Aude	1	Corrèze.	22
Aveyron	4	Creuse	15
Bouches-du-Rhône	3	Côtes-du-Nord	56
Calvados	14	Dordogne.	7

Doubs	10	Morbihan	30
Drôme	1	Nièvre	22
Eure	6	Nord	41
Eure-et-Loir	1	Orne	7
Finistère	81	Oise	50
Garonne (Haute-)	5	Pas-de-Calais	80
Gironde	2	Puy-de-Dôme	25
Hérault	5	Rhin (Haut-)	16
Ille-et-Vilaine	23	Rhône	2
Indre-et-Loire	9	Saône-et-Loire	4
Indre	20	Saône (Haute-)	29
Loir-et-Cher	6	Sarthe	18
Loire-Inférieure	31	Seine-et-Marne	22
Loire	2	Seine-Inférieure	70
Lot	12	Seine-et-Oise	45
Lot-et-Garonne	2	Seine	164
Manche	12	Somme	54
Mayenne	14	Sèvres (Deux-)	19
Marne	56	Vendée	26
Marne (Haute-)	15	Vienne	15
Maine-et-Loire	42	Vosges	36
Meurthe-et-Moselle	78	Vienne (Haute-)	37
Meuse	23	Yonne	7

*
* *

PERSONNES TRAITÉES, MORTES DE LA RAGE APRÈS LE TRAITEMENT.

AUDÉON, née Augustine Chaumont, soixante-douze ans, demeurant à Bois-de-Cené (Vendée).

Mordue le 26 mars, à la paume de la main droite. Quatre morsures pénétrantes qui ont saigné, non cautérisées.

Traitée du 3 au 23 avril. Morte de la rage le 31 mai.

Les animaux inoculés avec le bulbe du chien mordeur le 27 mars ont pris la rage le 23 mai.

POISSON (Simone), quatorze ans, demeurant à Bourges (Cher).

Mordue le 20 novembre, au mollet droit : trois morsures pénétrantes qui ont saigné et qui ont été lavées à l'eau oxygénée

Traitée du 22 novembre au 11 décembre.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 13 février. Morte le 16 février.

Le chien a été reconnu enragé par M. Foncelle, vétérinaire à Bourges.

LOUVIGNÉ (Léon), treize ans, demeurant à Vieuvy (Mayenne).

Mordu le 24 janvier, trois morsures pénétrantes à la paume de la

main gauche, qui ont saigné et qui ont été lavées à l'alcool 3 heures après.

Traité du 2 au 19 février.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 22 juin. Il succombe le 27 juin.

Le chien a été reconnu enragé par M. Bonnière, vétérinaire à Vieuvy.

Kergouet (Simone), cinq ans, demeurant à Quiberon (Morbihan).

Mordue le 19 juin. Deux morsures au poignet droit, qui ont saigné, non cautérisées.

Traitée du 21 juin au 8 juillet. Morte de la rage le 11 octobre,

Trois autres personnes, mordues à la figure par le même chien, ont subi le traitement et se portent bien. Le chien a été reconnu enragé par M. Le Nouvoux, vétérinaire à Auray.

Personnes prises de rage en cours de traitement.

Bertin (Georges), trois ans, demeurant à Saint-Just-Sauvage (Marne).

Mordu le 15 décembre. Deux morsures pénétrantes à la joue gauche, une à la lèvre supérieure, qui ont saigné et qui ont été lavées à la teinture d'iode.

Traité du 17 au 30 décembre.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 30 décembre. Il succombe le 2 janvier.

Le chien a été reconnu enragé par M. Pereladas, vétérinaire à Romilly-sur-Seine.

Kuernin (Joséphine), sept ans, demeurant à Quiberon (Morbihan).

Mordue le 19 juin. Deux morsures pénétrantes à la lèvre supérieure, une autre à la joue gauche qui ont saigné et qui ont été lavées à l'eau oxygénée.

Traitée du 21 juin au 13 juillet.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 14 juillet. Morte le 16 juillet. Kuernin avait été mordue par le même chien que Kergouet (Simone).

Alison (Émile), cinquante-huit ans, vétérinaire, demeurant à Nancy (Meurthe-et-Moselle).

Mordu le 4 août. Deux morsures pénétrantes à la lèvre supérieure, qui ont saigné et qui ont été lavées à l'eau oxygénée.

Traité du 26 août au 17 septembre.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 18 septembre. Mort à l'hôpital Pasteur le 20 septembre.

Chien reconnu enragé par M. Morange, vétérinaire à Nancy.

Les animaux inoculés avec le bulbe de l'animal mordeur le 3 août ont pris la rage le 1er octobre.

Duponchel, née Marie Douhay, soixante-douze ans, demeurant à Vaudricout (Somme).

Mordue le 30 mai. Lèvre fendue de la narine droite à la bouche ; une autre morsure à la racine sur le nez, qui ont saigné, non cautérisées.

Traitée du 1er au 18 juin.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 19 juin. Morte à l'hôpital Pasteur le 22 juin.

Chien errant, a disparu après avoir mordu.

Personnes traitées, mortes de la rage moins de 15 jours après le traitement.

Leroux (Théodore), soixante ans, demeurant à Monville (Seine-et-Oise).

Mordu le 1er avril. Deux morsures pénétrantes à la face dorsale de la main droite, qui ont saigné et qui ont été cautérisées avec la teinture d'iode.

Traité du 9 avril au 3 mai.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 6 mai.

Mort à l'hôpital Pasteur le 10 mai.

Chien errant, a disparu après avoir mordu.

Maurand (Juliette), six ans, demeurant à Limours (Seine-et-Oise).

Mordue le 14 octobre. Joue gauche, trois morsures pénétrantes, qui ont saigné et qui ont été lavées à l'eau oxygénée.

Traitée du 15 octobre au 8 novembre.

Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 22 novembre. Morte le 28 novembre.

Chien inconnu, a disparu après avoir mordu.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

32e ANNÉE JUILLET 1918 N° 7

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de É. Metchnikoff.

BACTERIUM PROTEUS ANINDOLOGENES

par J. J. van LOGHEM,
Directeur du Département d'Hygiène tropicale de l'Institut colonial, à Amsterdam.

En étudiant les urines d'un malade pneumaturique, j'isolai — il y a neuf ans — un bacille qui montre une forte ressemblance avec le bacille d'Hauser : un bâtonnet mobile, liquéfiant rapidement la gélatine, faisant fermenter des sucres, etc., et donnant une coloration rouge-vineux dans les cultures peptonisées, auxquelles on a ajouté de l'acide sulfurique pur et du nitrite de potassium (réaction de l'indol de Salkowski).

Mon collègue, le Dr Steensma, démontra que cette matière colorée n'était nullement identique avec le nitrosindol; alors qu'on peut distiller l'indol, la substance-mère de la matière rouge de notre bacille ne quitte pas le milieu peptonisé, soumis à la distillation.

Cette différence entre le *Bacterium proteus vulgare* et notre bacille s'est montrée d'une constance absolue. Les cultures de ce dernier en solution de peptone donnent, jusqu'aujourd'hui, une réaction de Salkowski très prononcée, tandis que les autres réactions de l'indol restent négatives. Notre nouveau bacille *Proteus* est toujours incapable de produire de l'indol, de sorte

que j'ai proposé de le considérer comme une espèce nouvelle, sous le nom de *Bacterium proteus anindologenes*.

Depuis, on a rencontré plusieurs représentants de notre nouvelle espèce.

J'ai pu isoler une deuxième culture du *Bacterium proteus anindologenes* du pus d'un abcès de la paroi abdominale d'un malade, soigné dans la clinique du professeur Ruitinga; probablement, cet abcès provenait de l'intestin. Aucune différence n'a pu être constatée entre le bacille du pus et celui de l'urine du malade pneumaturique; ses cultures en milieu peptonisé donnaient la même *pseudo-réaction* de Salkowski et, ce qui était important, un sérum de lapin immunisé contre le bacille de l'urine agglutinait aussi le bacille du pus.

Pendant notre séjour à Sumatra, ma femme et moi avons fait des recherches spéciales sur la fréquence du bacille *Proteus* anindologène. Sur 30 bacilles *Proteus*, isolés du contenu de l'intestin humain, 27 donnaient les réactions de l'indol, et 3 la *pseudo-réaction* de Salkowski.

Ces trois derniers, nous les avons examinés aussi au point de vue sérologique et comparés avec le bacille n° 1, provenant du malade pneumaturique. Nous avons immunisé des lapins contre nos bacilles anindologènes, et d'autres lapins contre les vrais *Proteus* Hauseri, et nous avons examiné le pouvoir agglutinant des sérums de tous ces lapins vis-à-vis des différents bacilles.

Les résultats de ces expériences n'étaient pas douteux; les sérums anindologènes agglutinaient tous les quatre représentants de notre nouvelle espèce, sans aucune influence spécifique sur des bacilles indologènes (V. le tableau), tandis que toute action spécifique des sérums « indologènes », vis-à-vis des bacilles anindologènes, était absente.

Tout récemment, M. Baudet a publié un mémoire intéressant sur les réactions de l'indol, dans lequel il annonce avoir isolé trois bacilles *Proteus*, donnant la *pseudo-réaction* de Salkowski. Une des cultures provenait du pus d'un empyème, les deux autres furent isolées des urines. Nous n'avons pas encore fini l'étude de ces cultures, que M. Baudet a bien voulu mettre à notre disposition.

CULTURES	CONTROLE	DILUTION DU SÉRUM ANINDOLOGÈNE				
		50	100	250	500	1.000
B. prot. anindologenes. V. C. 16.	—	Clar.	Clar.	Clar.	Clar.	Clar.
B. — — V. C. 8.	—	+++	+++	+++	+++	++
B. — — L. P. 2.	—	(Clar)	(Clar)	(Clar)	(Clar)	+++
B. — — Pneum. 1905.	—	Clar.	Clar.	Clar.	Clar.	+++
B. prot. indologenes. V. C. 3 . .	—	—	—	—	—	—
B. — — V. C. 4 . .	—	+	+	—	—	—
B. — — V. C. 6 . .	—	—	—	—	—	—
B. — — V. C. 12 . .	—	—	—	—	—	—
B. — — V. C. 13 . .	—	—	—	—	—	—
B. — — V. C. 14 . .	—	—	—	—	—	—
B. — — V. C. 22 . .	—	—	—	—	—	—
B. — — Pol.	—	—	—	—	—	—

— réaction d'agglutination négative.
+ réaction faible.
+++, ++, réaction plus ou moins forte, sans clarification complète.
Clar., (Clar), clarification complète, ou presque complète.

En résumant, nous pouvons conclure que, parmi les différentes espèces du groupe des bacilles *Proteus*, il y en a une espèce qui se distingue des autres par l'impuissance de produire de l'indol. Dans le milieu peptonisé, on constate la présence d'une matière qui donne une coloration rouge-vineux (un peu plus rouge que le nitrosoindol) avec l'acide sulfurique et la nitrite de potassium.

Je propose d'appeler ce bacille (qui est peut-être identique avec l'*Urobacillus liquefaciens septicus Krogius*) : *Bacterium proteus anindologenes*.

La signification pathologique des microbes de la putréfaction est une des questions nombreuses, étudiées et éclairées par le génie de Metchnikoff. C'est pour moi une joie spéciale que ma

modeste contribution à l'étude de ces microbes puisse trouver une place dans le livre jubilaire de notre Maître vénéré.

Avril 1914.

Annotation, mai 1918. — Des recherches poursuivies depuis la rédaction de ce mémoire, surtout chez des nourrissons, ont affirmé la nature spécifique du *Bacterium anindologenes*. Je renvoie le lecteur spécialement au travail du D[r] K. P. Groot, dont le rapport a été offert à la rédaction des *Annales de l'Institut Pasteur*.

V. L.

BIBLIOGRAPHIE

J. J. van Loghem. — *Centralbl. f. Bakteriologie*. Abt. I. Orig. Bd 38, 1905 p. 425.

F. A. Steensma. — *Centralbl. f. Bakteriologie*. Bd 41, 1906, p. 295.

J. J. van Loghem und J. C. W. van Loghem-Pouw. — *Ibid.*, Bd 66, 1912, p. 19.

E. A. R. F. Baudet. — *Folia Mikrobiologica*, Bd II, p. 261.

RECHERCHES

SUR LE

BACTERIUM (PROTEUS) ANINDOLOGENES

par le Dr K. P. GROOT (Amsterdam)

[Communication de la section d'hygiène tropicale de l'Institut colonial d'Amsterdam (directeur : Prof. J. J. van Loghem)].

Dans la littérature bactériologique des dernières années on peut remarquer un intérêt croissant pour le groupe des bacilles *Proteus*.

Hauser (1885) décrivit, le premier, sous le nom de *Proteus vulgaris*, des bacilles ayant la forme de bâtonnets longs, très mobiles, ne prenant pas le Gram et liquéfiant rapidement la gélatine. Sur la surface de la plaque ils forment des colonies émettant des prolongements typiques. La nécessité d'attribuer aussi une action pathogène à ces microbes de putréfaction ressort du grand nombre d'observations cliniques où l'on a rencontré des *Proteus* dans des pus d'abcès et d'empyèmes, ainsi que dans des inflammations de la vessie et de l'intestin. Booker et Metchnikoff veulent voir dans le *Proteus* la cause du choléra *infantum*.

Toutefois, en comparant les descriptions des diverses races de *Proteus*, on trouve une différence notable dans leur conduite à l'égard de certains milieux de culture et de certaines méthodes de coloration.

Déjà Hauser distinguait, à côté du type principal du *Proteus vulgaris*, qui liquéfie rapidement la gélatine, deux autres espèces : le *Proteus mirabilis*, la liquéfiant lentement, et le *Proteus Zenkeri* ne la liquéfiant pas du tout.

Sous le rapport biologique aussi, les bacilles décrits diffèrent largement entre eux. Wolf trouva que le sérum d'un lapin, injecté avec un certain bacille, agglutinait seulement ce même

bacille, alors que d'autres n'ont pu constater une pareille conduite individuelle; au contraire, avec le sérum d'une certaine culture ils ont pu agglutiner aussi des cultures d'autre provenance.

Cela donne bien fortement l'impression qu'on n'a pas affaire à des bacilles appartenant à un seul groupe, mais plutôt à un assemblage d'espèces différentes ayant quelques propriétés en commun. Ce n'est pas à tort qu'on a appelé le groupe Proteus le magasin de bric-à-brac de la bactériologie.

Or, dans les dernières années, des observateurs se sont occupés d'une propriété biochimique très peu étudiée jusque-là et ont trouvé dans quelques cultures une propriété pouvant peut-être fournir un critérium pour une meilleure systématique du groupe Proteus, ou du moins pouvant amener la délimitation d'un groupe plus rigoureusement déterminé.

Le bacille dans lequel cette propriété fut remarquée pour la première fois fut isolé par Van Loghem de l'urine d'un diabétique montrant le symptôme de la pneumaturie. Il s'agissait d'un bâtonnet mobile, liquéfiant rapidement la gélatine, faisant fermenter les sucres, etc., et montrant, immédiatement après l'addition d'acide sulfurique pur et de nitrite de potassium à une culture d'eau peptonisée, une belle réaction colorée. Steensma démontra que cette réaction ne provenait pas de l'indol par les arguments suivants :

1. Avec la réaction de Salkowski il se forme une substance rouge, qu'on peut distinguer du nitroso-indol à l'aide du spectroscope, puisqu'elle produit une bande d'absorption dans le vert.

2. L'addition du nitroprussiate de sodium, de lessive de potassium et d'acide acétique glacial ne produit pas de changement en bleu.

3. La réaction d'après Ehrlich est négative.

4. Distillée avec de la vapeur d'eau à 100°, cette substance, contrairement à l'indol, ne passe pas. Dans le liquide qui reste, on peut en constater la présence.

5. A l'aide d'alcalis on peut la retirer de l'éther acétique.

Pendant leur séjour à Sumatra M. et Mme Van Loghem, à la suite de recherches spéciales, sur 30 *Proteus* isolés du contenu de l'intestin humain, en ont trouvé 3 qui, d'après

leurs propriétés, devaient être regardés comme *Proteus* anindologènes. Les réactions d'agglutination avec ces bacilles et le bacille anindologène original Van Loghem ont démontré que ces cultures anindologènes s'agglutinent réciproquement.

Par contre les cultures indologènes ne sont pas du tout agglutinées par les sérums composés à l'aide de bacilles anindologènes, de même les sérums des cultures indologènes n'avaient aucune influence sur les cultures anindologènes. Au point de vue sérologique, l'existence d'une ligne de démarcation entre les bacilles anindologènes, d'un côté, et les bacilles indologènes de l'autre, était donc démontrée.

Dans la clinique chirurgicale de Leyde, M. Baudet isola de l'urine de différents malades et du pus d'un empyème 3 *Proteus* et aboutit à des résultats analogues. Le rapport sérologique entre ces bacilles était spécifique, mais à la suite d'un examen fait plus tard par Van Loghem un rapport moins spécifique entre ces bacilles et les bacilles Van Loghem parut exister. Pourtant, au point de vue sérologique, la différence entre ces bacilles anindologènes et les bacilles indologènes était très nettement accusée.

En France, M. Albert Berthelot a combattu l'adoption de cette nouvelle espèce comme *Bacterium anindologenes*. Il est vrai que, dans une longue série de *Proteus*, il en avait trouvé quelques-uns qui ne produisaient pas d'indol dans l'eau peptonisée; mais, ayant passé par des milieux contenant du tryptophane, après un certain laps de temps ils finirent par produire de l'indol. M. Berthelot ne veut donc regarder l'absence d'indol dans les cultures à l'eau peptonisée que comme une variation biochimique ; il conclut que : « L'espèce *Proteus anindologenes* Van Loghem n'a aucune raison d'être. »

Baudet, au contraire, n'a pu découvrir, même dans les milieux au tryptophane, à l'aide d'aucune des réactions, de l'indol dans ses cultures.

En rassemblant toutes ces données, nous trouvons dans les recherches susdites l'indication qu'un examen plus ample de la faculté de produire de l'indol devrait nous fournir le moyen de séparer au moins une espèce du groupe Proteus et de tous les bacilles rassemblés sous le nom de *Bacterium vulgare*. Si, en contradiction avec le résultat obtenu par Berthelot, la suppo-

sition d'une nouvelle espèce, *Bacterium proteus anindologenes* Van Loghem se trouvait justifiée, je voudrais obtenir de plus amples lumières sur la façon dont cette espèce se trouve dans la nature, spécialement sur ses rapports avec l'homme.

Recherches sur le pouvoir indologène. — Pour démontrer la présence de l'indol on se sert de plusieurs méthodes. Les plus connues sont :

1° Celle de Salkowski-Kitasato. A 10 cent. cubes de culture on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique pur et ensuite 1 cent. cube de nitrite de potassium. On obtient ainsi le nitroso-indol, qu'on reconnaît à sa coloration rouge-violet. L'acide pur peut causer des colorations en brun quelquefois embarrassantes; on peut remédier à cette réaction secondaire en agitant le liquide avec du chloroforme, dans lequel la substance colorante rouge passe tout de suite.

2° Celle d'Ehrlich. A 10 cent. cubes de culture on ajoute 5 cent. cubes de solution de paradiméthylamidobenzaldéhyde dans l'alcool et l'acide chlorhydrique, puis 5 cent. cubes de solution saturée de persulfate.

En cas d'une réaction positive, une couleur rouge-violet se déclare; une réaction faible est quelquefois difficile à reconnaître. On peut alors avoir recours à la distillation, ou agiter avec l'éther, le chloroforme, la benzine. Pour se rendre compte de la formation de l'indol, on cultive les bacilles dans un milieu peptonisé. Ces milieux de culture se préparent avec les peptones du commerce dans lesquelles l'albumine a été transformée, sous l'action de la trypsine, en peptones et albumoses, substances chimiques plus simples.

A l'aide d'expériences, j'ai tâché d'élucider les questions suivantes :

a) Comment mes bacilles se comportent-ils vis-à-vis des différentes espèces de peptones?

b) Comment se comportent-ils vis-à-vis des milieux au tryptophane?

Les douze bacilles anindologènes mis à ma disposition étaient d'origines diverses, ce dont je parlerai plus tard. En vue du contrôle, j'ai compris quelques indologènes dans mes expériences.

Cultures dans l'eau peptonisée (peptone Witte). — Cette eau peptonisée fut préparée avec 1 p. 100 de peptone Witte et 1/2 p. 100 de sel marin. On y inocula les bacilles avec une anse d'une culture sur gélose. Les réactions furent contrôlées après deux et après douze jours.

Les cultures indologènes donnèrent la réaction d'Ehrlich et celle de Salkowski, toutes les deux positivement, alors que les cultures anindologènes ne donnaient positivement que le Salkowski. Dans les cultures anindologènes on n'a pu constater l'indol ni par distillation ni en extrayant avec l'éther. Dans le liquide passant à la distillation, aussi bien que par extraction à l'éther, les cultures indologènes donnaient une réaction positive.

La conclusion, confirmée par nombre d'expériences, doit donc être : *Ces bacilles ne produisent pas d'indol dans l'eau peptonisée à base de peptone Witte.*

Cultures dans la peptone Chassaing et la peptone Cornélis. — Le liquide nutritif fut préparé de la même manière. En général, les résultats étaient pareils à ceux de la peptone Witte. Pourtant deux phénomènes méritent notre attention. D'abord, la réaction du tube de contrôle, qui contient le milieu nutritif, tel quel : la réaction du tryptophane libre y était toujours positive; dans les tubes ensemencés elle était négative, dans plusieurs après quatre jours, dans tous après quatorze jours.

L'autre phénomène est la réaction d'Ehrlich dans les cultures âgées de quatorze jours des bacilles anindologènes. Dans plusieurs cas elle était clairement positive. Il était tout indiqué de rapprocher ces deux phénomènes entre eux et d'attribuer la réaction d'Ehrlich à la production d'indol par le tryptophane qui se trouve en petite quantité dans les peptones françaises.

Afin de confirmer cette supposition on distilla les cultures de quelques bacilles. Dans le liquide ayant distillé, on ne put démontrer la présence de l'indol. Évidemment, quoique la réaction d'Ehrlich soit positive, ce n'est donc pas d'une production d'indol qu'il s'agit. Ensuite, on traita les cultures de tous les bacilles d'après la méthode de Porcher et de Panisset, en les agitant avec de l'éther. Ici j'ai suivi exactement la méthode indiquée par Berthelot.

Dans les cultures anindologènes on n'a jamais pu constater

de cette façon la présence de l'indol. Aussi, dans le liquide de culture des bacilles non indologènes, la substance colorante rouge de la réaction d'Ehrlich ne passa pas dans le chloroforme.

Nous avons donc affaire ici à une production d'indol apparente, puisque la substance produisant cette réaction ne passe ni à la distillation, ni dans le chloroforme ou l'éther.

Cultures dans les milieux nutritifs au tryptophane. — Zipfel a composé un milieu nutritif avec le tryptophane et quelques sels. Il est d'une composition constante et absolument incolore. On y ensemença les cultures; après quatre jours la réaction de Salkowski était positive pour toutes, la réaction d'Ehrlich pour quelques-unes; après quatorze jours celle-ci était aussi positive pour toutes.

Cette fois encore évidemment la coloration rouge n'était pas due à l'indol; elle ne passa ni dans l'éther ni dans le chloroforme, tandis que, dans les cultures indologènes agitées avec de l'éther suivant le procédé de Berthelot, un anneau rouge-violet se montra tout de suite à l'endroit où l'acide chlorhydrique et l'éther se touchaient.

Enfin, je fis un dernier contrôle par la réaction au nitroprussiate de soude. Le résultat était toujours positif pour les indologènes, non pour les anindologènes.

Nous avons donc démontré que les différences entre les Proteus indologènes et anindologènes se manifestent aussi dans les milieux composés au tryptophane.

* * *

Recherches sérologiques sur le Bacterium anindologenes *et les Proteus indologènes.* — Comme il a été dit dans l'introduction, les communications sur l'agglutination des *Proteus* ne se confirment pas entre elles.

En premier lieu, surtout dans la littérature plus ancienne, la conception d'une conduite rigoureusement individuelle vis-à-vis de l'agglutination; chaque sérum immunisant agglutine seulement son propre bacille, conception qui dans les derniers temps (1911) est encore partagée par Cantu. D'autre côté l'opi-

nion que dans les *Proteus* on peut observer une certaine agglutination par groupes. Sous ce rapport l'observation de Van Loghem sur la réaction d'agglutination du *Proteus* anindologène est pleine d'intérêt.

Un lapin ayant été injecté avec un bacille anindologène, le sérum agglutina non seulement le bacille propre, mais encore trois autres bacilles anindologènes, n'exerçant aucune influence sur huit bacilles indologènes.

Le rapport entre les bacilles de Baudet (Leyde) et les bacilles de Van Loghem se révéla à ce dernier comme moins spécifique quoiqu'une affinité plus proche fût indiquée par le fait que le sérum préparé avec un des bacilles d'Amsterdam agglutinait un bacille de Leyde.

Vis-à-vis des bacilles indologènes la conduite des bacilles anindologènes était absolument pareille ; le sérum des indologènes ne les agglutinait pas, et leur sérum n'exerçait aucune influence sur les indologènes.

Dans mes propres recherches j'ai compris, outre les bacilles de Van Loghem et ceux de Baudet, encore huit autres anindologènes. Les résultats de réactions nombreuses et répétées ont été résumés avec ceux de Van Loghem dans le tableau synoptique I.

Un examen plus approfondi fait remarquer tout de suite deux faits. D'abord le manque de pouvoir agglutinant des deux derniers sérums à l'égard de bacilles autres que leur propre bacille; c'est avec les deux cultures indologènes qu'on a composé ces sérums.

Ensuite, que les indologènes n'éprouvent aucunement l'influence des sérums anindologènes.

La ligne double entoure les bacilles anindologènes et sépare les sérums des anindologènes d'avec ceux des indologènes. Les bacilles dans la partie séparée montrent tous entre eux une certaine affinité, quoique assurément nous ne puissions parler d'unité agglutinatoire.

En résumant, nous pouvons donc dire qu'entre les indologènes et les anindologènes il n'existe aucun rapport agglutinatoire et que les bacilles anindologènes exercent tous l'un sur l'autre une influence réciproque plus ou moins grande.

Tableau I.

	BACILLE	SÉRUMS ANINDOLOGÈNES					SÉRUMS INDOLOGÈNES	
		SÉRUM Pneumaturie	SÉRUM Urine II	SÉRUM empyème	SÉRUM Eld.	SÉRUM Urine I	SÉRUM Vulgaris I	SÉRUM Vulgaris II
Bacilles anindologènes.	Urine I	00	TT	TT	(T)(T)	TTTTT	00	0
	Urine II	00ΔΔ(T)	TTTT	TT	(T)(T)	TTTT	00	0
	Empyème	0	T	TT	(T)(T)	TTT	00	0
	Eld.	0	Δ	T	TT	(T)(T)	0Δ	0
	Pneumaturie	TTTTTT	0Δ	00	T	TO(T)0	00	0
	Til	O	0Δ	0	Δ	Δ	0	
	Ohne	T	TT	Δ	T	T	0	
	J	Δ	OO	O	O	O	0	
	K	O	ΔΔ	0	Δ	0	0	
	163	T	ΔΔ	O	0	0	0	
	Wien No. 27	O	0Δ	0	0	0	0	
	Hind.	TT	0Δ	0	Δ	0	0	
	Sumatra I	T						
	Sumatra II	T						
	Sumatra III	T						
Bacilles indologènes.	Vulgaris I	00	0	00	Δ0	00	TT	0
	Vulgaris II	0	Δ	0	0	0	Δ	T
	Jac.	0	0		0	0		
	Paard	0	0		0	0		
	Diks	0	0			0		
	Section	0	0		0	0		
	Indolog. S. 1	0						
	— 2	0						
	— 3	0						
	— 4	0						
	— 5	0						
	— 6	0						
	— 7	0						

Le *nombre* des signes se rapporte au *nombre* des expériences faites.
0 = totalement négatif.
Δ = dans une concentration peu élevée seulement jusqu'à + 1/10 du titre.
O = jusqu'à la moitié du titre.
(T) = presque totalement.
T = totalement.

* * *

La présence du Bacterium anindologenes *Van Loghem et du* Bacterium vulgare (*Hauser*) *Lehmann et Neumann dans la nature, spécialement par rapport à l'homme.* — Les bacilles du groupe *Proteus* se rencontrent fréquemment dans la nature;

mais quant à leur fréquence dans les différents milieux, les observateurs ne sont pas d'accord.

Ainsi quelques-uns déclarent que les *Proteus* se trouvent rarement dans l'intestin de l'homme normal, tandis qu'on leur oppose des informations comme celle de Macé : « Il se rencontre fréquemment dans le contenu intestinal de l'homme à l'état normal. »

C'est à Cantu que nous devons des recherches très étendues sur la fréquence des *Proteus*. Il les trouva dans tout ce qui environne l'homme, dans l'air, l'eau potable, le lait, le beurre, le fromage, les bananes, les saucissons, ainsi que dans l'homme lui-même, dans le contenu de l'intestin, la cavité buccale, la peau.

Dans la littérature peu étendue sur le *Bacterium anindologenes* nous ne trouvons que la communication de M. et Mme Van Loghem, qui dans le temps firent des recherches spéciales sur la présence du bacille anindologène. Du contenu intestinal d'indigènes ils isolèrent 30 *Proteus*, dont 3 anindologènes.

Un autre indice se trouve dans les cultures mises à ma disposition. Trois provenaient d'urines pathologiques, une d'un empyème, une des selles d'un individu malade de fièvre aphteuse tropicale, une des selles d'un nourrisson malade de diarrhée.

Fait remarquable : six bacilles envoyés par le musée bactériologique de Kral (de Vienne) comme *Proteus* sans rien de plus se trouvèrent être anindologènes. Les informations demandées et reçues plus tard sur ces bacilles étaient peu détaillées, mais il est certain qu'ils provenaient de produits humains.

Afin de mieux connaître le terrain d'expansion du *Bacterium anindologenes*, des recherches spéciales ont été faites. Avec le contenu intestinal de douze sujets autopsiés pris au hasard, des cultures de gélatine ont été ensemencées et quatre fois on a trouvé des *Proteus*. De même on retire des *Proteus* de selles d'hommes à l'état normal, de viande pourrie, d'urine en putréfaction, de terre provenant de jardins. Dans la peptone Witte tous ces bacilles produisaient de l'indol.

Metchnikoff put déceler en 204 cas sur 218 des *Proteus* dans des conditions pathologiques ; il ne s'occupa pas spécialement

de la production de l'indol. Cela m'amena à faire de nouvelles recherches sur le *Proteus* dans les selles d'enfants.

Dans les selles de 49 enfants de l'hôpital pour enfants « Emma », à Amsterdam, je trouvai 16 fois des *Proteus*. A cette occasion je n'ai plus appliqué la méthode de la plaque de gélatine, parce que d'autres bacilles, liquéfiant la gélatine, rendent difficile l'isolement des *Proteus*. J'ai préféré le procédé de Cantu, qui me parut plus rationnel ; il profite d'une propriété des bacilles du groupe Proteus qu'on ne rencontre dans aucun autre bacille, c'est-à-dire de la faculté de pousser très rapidement à la surface de la gélose. On inocula une parcelle de matières fécales dans l'eau de condensation d'un tube de gélose ; après 24 heures, à une température de 37°, les *Proteus* avaient envahi toute la surface de la gélose.

Des selles des 26 nourrissons, 14 étaient positives, tandis que chez 15 enfants d'âge plus avancé on ne trouva que deux fois les *Proteus*. Des 16 *Proteus* isolés de cette façon, on examina la production d'indol dans la peptone Witte ; 8 d'entre eux se montrèrent anindologènes. Le tableau II expose les résultats de ces recherches.

Tableau II.

MATIÈR	NOMBRE D'EXAMENS	NOMBRE de CAS POSITIFS	P. 100	NOMBRE D'ANINDOLOGÈNES
Contenu de l'intestin (autopsie).	12	4	33,3	0
Selles d'homme à l'état normal	10	4	40	0
Viande de cheval en putréfaction.	6	6	100	0
Viande de bœuf en putréfaction	2	2	100	0
Terre de jardin.	7	4	57	0
Urine en putréfaction.	5	3	60	0
Selles de nourrissons de l'Hôpital Emma . . .	26	14	53,7	7
Selles d'enfants plus âgés de l'Hôpital Emma.	23	2	8,5	1

On peut y voir l'indication que dans les selles des nourrissons les bacilles anindologènes sont plus nombreux que dans celles des adultes.

Outre l'objection qu'il s'agit ici d'un nombre d'expériences relativement restreint il y a encore une autre difficulté.

Les *Proteus* provenant des selles d'enfants ont été tous isolés suivant la méthode décrite ci-dessus. Or il se pourrait que le *Bacterium anindologenes* formât relativement plus de colonies expansives que l'indologène et qu'ainsi la méthode opérât une certaine sélection parmi les *Proteus* en faveur des anindologènes.

Outre la question de la production d'indol, une autre nous intéressait : celle de la conduite de ces nouvelles cultures vis-à-vis de deux sérums anindologènes qui nous restaient.

Dans les expériences d'agglutination avec ces sérums nous constatâmes que l'un influençait 4, l'autre 7 sur 8 nouvelles cultures anindologènes.

Les indologènes isolés des selles, de la terre des jardins, etc., n'étaient pas agglutinés par ces sérums.

Au point de vue sérologique, il y avait donc un accord parfait entre ces rapports et ceux constatés auparavant chez les bacilles anindologènes.

SUR LA NATURE ANAPHYLACTIQUE DE L'INTOXICATION PARASITAIRE

par L. VAN ES et A. F. SCHALK.

(Travail du département vétérinaire de la Station agricole du Nord Dakota.)

I

ORIGINE DE NOS RECHERCHES

L'anémie infectieuse du cheval, depuis la découverte de sa cause évidente, le virus filtrant ultra-microscopique de Vallée et Carré [1, 2, 3], a fait l'objet de plusieurs travaux sérieux. Ces recherches, poursuivies par un nombre d'auteurs avec un matériel d'origines les plus diverses, ont partout confirmé le rôle joué par le virus mis à jour par les savants français précités.

Il n'y a rien d'étonnant donc que la nouvelle explication de l'étiologie de la maladie, proposée par M. M. Seyderhelm (de Strasbourg), n'ait pas manqué d'éveiller un vif intérêt chez ceux qui s'occupent d'une étude sur l'anémie infectieuse du cheval.

Ces derniers auteurs, dans une série de trois articles [4, 5, 6], publient leurs recherches sur la nature, l'étiologie, l'histologie pathologique et le traitement de l'anémie pernicieuse du cheval. Passant sur les détails de ces travaux, les conclusions suivantes s'imposent à notre attention :

« 1. L'anémie pernicieuse des chevaux peut être provoquée artificiellement dans tous ses détails par des injections d'extraits aqueux de *Gastrophilus equi* et *hemorrhoidalis* (*Œstrus*).

« 2. D'après son mode d'action, sa manière d'être vis-à-vis

des influences physiques et chimiques, l'ingrédient actif est un poison animal, dénommé par nous : *Œstrine*.

« 3. L'action toxique de l'œstrine est exclusivement spécifique pour le cheval (et l'âne).

« 4. L'œstrine est également résorbée par le canal gastro-intestinal du cheval.

« 5. L'œstrine se trouve dans les excrétions naturelles des larves de *Gastrophilus*.

« 6. L'action toxique de l'espèce *Gastrophilus hemorrhoidalis* est plusieurs fois plus forte que celle de *Gastrophilus equi*.

« 7. L'anémie pernicieuse, provoquée artificiellement par des extraits des larves des œstres, peut aussi être transmise à des chevaux sains par le sang (aussi le sang des chevaux rendus malades par cette transmission transporte la maladie).

« 8. L'anémie pernicieuse des chevaux, sévissant *in natura*, n'est pas provoquée par un micro-organisme ultravisible, mais par l'œstrine excrétée par les larves de *Gastrophilus*. En première ligne, les larves de *Gastrophilus hemorrhoidalis* sont, par leur toxicité particulière, d'importance pour la pathogénèse de la maladie. »

Nous admettons bien volontiers que les conclusions de M. M. Seyderhelm nous frappaient d'étonnement et, il faut le dire, nous remplissaient de doute. L'idée que des insectes jouent un rôle dans la transmission n'a rien de nouveau, ni d'inattendu, mais le rejet d'un virus vivant comme la cause d'une maladie d'apparence infectieuse ne manque pas de nous surprendre.

Tout au moins les résultats rapportés dans le travail plus haut ne pouvaient pas être acceptés sans une vérification soigneuse et, par conséquent, nous nous sommes chargés de faire quelques expériences ayant pour but de jeter plus de lumière sur la théorie nouvelle avancée par les auteurs alsaciens.

En premier lieu, nos efforts furent dirigés vers une étude des conséquences provoquées par les injections des extraits préparés des larves de *Gastrophilus* sur le cheval.

Voici les résultats principaux de nos recherches :

II

TOXICITÉ DES EXTRAITS D'ŒSTRES

A. — *Par voie veineuse.*

I. — Vieux cheval en bonne santé, n° 2.612. Avant l'injection la fréquence du pouls était 36 par minute; celle de la respiration 18. La température était normale, comme la sensibilité générale.

Dix larves d'une espèce de *Gastrophilus* indéterminée prise de l'estomac du cheval n° 2.548, un cas d'anémie infectieuse. Les 10 larves furent broyées dans de l'eau salée au titre physiologique et filtrées à travers un peu d'ouate. Après le lavage du filtre, la solution, 12 cent. cubes, fut injectée par la voie intraveineuse au cheval n° 2.612.

L'injection fut finie le 21 novembre 1914, à 9 h. 42 du matin, produisant les conséquences suivantes :

A 9 h. 45 : pouls, 75 par minute. Respirations, 45 par minute. Température, 37°6 C. La diaphorèse commença. La sensibilité devint plus vive et la pression du sang augmenta.

A 9 h. 50 : pouls, 90 par minute. Respirations, 52 par minute. Température, 37°8 C. L'action péristaltique devint violente; les excréments étaient ramollis. Il y eut une sudation profuse et le sujet était excité.

A 9 h. 55 : pouls, 90 par minute. Respirations, 45 par minute. Température, 37°8 C. Le péristaltisme intestinal était moins violent. Les excréments étaient liquides. La sueur était abondante, mais le cheval était plus tranquille. La pression artérielle déclina.

A 10 heures : pouls, 70 par minute. Respirations, 36 par minute. Température, 37°6 C. L'action péristaltique se calma. Évacuations liquides. La sudation diminua. La sensibilité était sous-normale. La pression du sang était presque normale.

A 10 h. 5 : pouls, 70 par minute. Respirations, 36 par minute. Température, 37°6 C. Il y eut des évacuations liquides. La sueur décrut. La sensibilité et la pression du sang étaient sous-normales.

A 10 h. 10 : pouls, 70 par minute. Respirations, 30 par minute. Température, 37° C. Le péristaltisme n'était plus appréciable. Les évacuations et la diaphorèse avaient cessé. La sensibilité et la pression artérielle continuèrent sous-normales.

A 10 h. 15 : pouls, 66 par minute. Respirations, 23 par minute. Température, 36°8 C. Le péristaltisme resta inappréciable. Il y eut une petite évacuation liquide. La sensibilité et la pression du sang étaient sous-normales.

A 10 h. 30 : pouls, 72 par minute. Respirations, 16 par minute. Température, 37°7 C. Le péristaltisme était faiblement perceptible. Il y eut des évacuations aqueuses. La sensibilité resta sous-normale, mais la pression du sang devint normale.

A 11 heures : pouls, 79 par minute. Respirations, 13 par minute. Température, 37°7 C. L'action péristaltique était légèrement perceptible. Les excréments devinrent semi-solides. La sensibilité resta sous-normale.

A 12 heures : pouls, 54 par minute. Respirations, 13 par minute. Température, 37°7 C. Il y avait des évacuations semi-solides. La sensibilité revenait.

A 1 h. 30 : pouls, 40 par minute. Respirations, 13 par minute. Température, 37°7 C. Les défécations avaient cessé ainsi que la sudation. Le sujet était plus animé et la pression artérielle était normale.

La température au soir du jour de l'injection s'élevait à 39°5 C, et pendant les 134 jours qu'on laissa vivre le cheval, il y eut plusieurs élévations de la température, mais seulement une fois elle atteignit 38°9 C.

L'autopsie ne révéla que quelques ecchymoses sous-endocardiques. L'anémie et l'albuminurie ne furent pas constatées.

II. — Un second cheval, n° 3.294, acheté comme suspect d'être atteint de la « fièvre des marais » ou anémie infectieuse, mais dont la diagnose resta très douteuse, fut inoculé à son tour.

Neuf larves d'une espèce de *Gastrophilus* indéterminée (n° 3.401), recueillies dans les environs de Chicago, furent broyées dans un mortier, mélangées avec de l'eau salée et macérées pendant 48 heures à la température de la glacière. Au

bout de ce temps la masse fut agitée, filtrée et, après le rinçage du filtre, la filtration fut répétée.

Le 27 septembre 1915, l'extrait filtré fut injecté au cheval n° 3.294 par la voie *veineuse* : l'injection était terminée à 3 h. 55 de l'après-midi. Voici les résultats de l'injection :

A 3 h. 58 : défécation.

A 4 heures : respirations, 40 par minute. Défécation. Sudation. Salivation. Écoulement muqueux des narines.

A 4 h. 2 : pouls, 80 par minute.

A 4 h. 5 : respirations, 30 par minute. Défécation.

A 4 h. 10 : pouls, 78 par minute. Température, 37°5 C. Sudation profuse. Les naseaux émettaient une mucosité visqueuse et filante.

A 4 h. 15 : pouls, 82 par minute. Respirations, 45 par minute. La diaphorèse continuait. Colique légère. Efforts pénibles à déféquer. Les muqueuses visibles se rougissaient. Les respirations étaient courtes et saccadées.

A 4 h. 25 : pouls, 82 par minute. Respirations, 40 par minute. Température, 37°4 C. Faiblesse musculaire.

A 4 h. 30 : respirations, 38 par minute. Sudation moins profuse.

A 4 h. 45 : pouls, 70 par minute. Respirations, 25 par minute. Température, 37°6 C.

A 4 h. 52 : défécation copieuse, suivie par des mucosités sanguinolentes.

A 5 heures : pouls, 64 par minute. Respirations, 18 par minute. Muqueuses pâles.

A 5 h. 30 : pouls, 62 par minute. Respirations, 16 par minute. Défécation suivie d'une petite quantité de mucus sanguinolent. Cessation de la sudation et de l'écoulement nasal.

A 5 h. 55 : défécation.

A 6 heures : pouls, 62 par minute. Respirations, 16 par minute. Température, 37°6 C.

Le lendemain, le sujet manifesta de la dépression, un pouls de 75 par minute, dont la haute fréquence continua jusqu'à la mort qui survint à 5 heures du soir.

L'autopsie révéla une condition hémorragique de la muqueuse du gros intestin, tandis que le mésocôlon présentait plusieurs taches hémorragiques. Plusieurs gros infarctus hémorragiques

furent constatés dans l'écorce rénale. L'épicarde, surtout près de la base du cœur, était parsemé de pétéchies. L'endocarde était intensivement hémorragique. La muqueuse de la vessie était légèrement ecchymosée.

B. — *Par voie sous-cutanée.*

I. — Un cheval sain, n° 3.403, reçut par la voie *sous-cutanée* un extrait préparé de 4 larves et demie, d'une espèce de *Gastrophilus* indéterminée (n° 3.401), recueillies près de la ville de Chicago. Les larves furent broyées et macérées pendant 48 heures dans de l'eau salée, à la température de la glacière. Au bout de cette période, la masse fut secouée mécaniquement et filtrée. Après le lavage du filtre avec un peu d'eau salée, le filtrage fut répété.

Avant l'injection, on constata : pouls, 44 par minute. Respirations, 16 par minute. Température, 37°8 C.

L'injection eut lieu le 27 septembre 1915 et fut finie à 4 heures de l'après-midi. Les résultats suivants furent observés :

A 4 h. 20 : pouls, 60 par minute. Respirations, 24 par minute. Température, 37°7 C. Le sujet devint inquiet et une sécrétion sudorale commença.

A 4 h. 25 : respirations, 32 par minute. De temps en temps, des contorsions faciales furent observées. La sueur commençait à couler de l'animal.

A 4 h. 33 : respirations, 44 par minute.

A 4 h. 35 : la sueur coulait profusément. Les muqueuses étaient congestionnées.

A 4 h. 40 : respirations, 38 par minute. Température, 37°8 C.

A 4 h. 45 : respirations, 40 par minute.

A 4 h. 55 : le pouls était trop faible pour être compté.

A 5 h. 5 : pouls, 45 par minute. Les muqueuses étaient pâles.

A 5 h. 9 : respirations, 40 par minute.

A 5 h. 15 : le sujet présenta un affaiblissement musculaire.

A 5 h. 25 : respirations, 36 par minute.

A 5 h. 30 : le cheval était plus tranquille.

A 6 heures : pouls, 50 par minute. Respirations, 35 par minute. Température, 37°6 C.

Entre 4 et 6 heures, 14 évacuations fécales furent constatées.

Le lendemain de l'injection, la fréquence du pouls était 45 par minute ; le sujet était très affaibli et inquiet, mais montra quelques indices d'amélioration. Après un autre jour, l'appétit était perdu et ne revint plus.

Le cheval vécut 8 jours après l'injection, et pendant ce temps la température oscilla entre 37°6 C. et 39°4 C. Un examen du sang montra 10.216.000 globules rouges par millimètre cube et l'hémoglobine à 95 p. 100 de la normale.

L'autopsie montra une entérite sévère, une péritonite fibrineuse et une gastrite près de l'orifice pylorique. Une néphrite aiguë, assez intense, fut constatée, et l'urine trouvée dans la vessie contenait de l'albumine en abondance.

II. — Un extrait préparé de la manière usuelle d'une larve de *Gastrophilus equi* (n° 3.427) fut injecté par la voie souscutanée au cheval n° 3.422, un sujet sain montrant un pouls à 40 par minute, respirations à 15 par minute, et une température à 37°6 C. L'injection, finie à 3 h. 25 de l'après-midi, le 1er novembre 1915, avait les résultats suivants :

A 3 h. 40 : pouls, 42 par minute. Respirations, 16 par minute.

A 3 h. 45 : légère colique flatulente.

A 3 h. 50 : péristaltisme augmenté. Défécation.

A 4 heures : pouls, 42 par minute. Respirations, 20 par minute. Température, 37°9 C.

A 4 h. 15 : pouls, 40 par minute. Respirations, 28 par minute.

A 4 h. 40 : pouls, 44 par minute. Respirations, 21 par minute. Température, 38° C.

A 4 h. 53 : flatus. Défécation.

A 5 h. 3 : flatus.

A 5 h. 30 : pouls, 42 par minute. Respirations, 20 par minute. Température, 38°2 C.

Le sujet fut observé jusqu'au 10 juillet 1916 et, durant ce

temps, des altérations notables ne furent pas constatées, excepté les accès suivants de température :

7 décembre 1915	39°3 C.
6 avril 1916	38°3 C.
7 mai 1916	38°3 C.
2 juillet 1916	38°3 C.
3 juillet 1916	38°3 C.

Le cheval fut tué le 10 juillet 1916 et la seule lésion macroscopique décelée par l'autopsie consistait en de nombreuses ecchymoses sous-endocardiques.

C. — *Action de la dialyse sur le poison des Œstres.*

I. — Après broyage, 15 larves de *Gastrophilus* indéterminées furent macérées pendant 48 heures dans de l'eau salée physiologique, à la température de la glacière. Le mélange, après l'addition d'un peu d'eau distillée, fut filtré à travers un Berkefeld et le liquide filtré dialysé pendant 8 jours. Au bout de ce temps, la matière dialysée aussi bien que la matière non dialysée furent desséchées à la température du laboratoire avec l'aide d'un courant d'air.

Le 18 novembre 1915, la matière dialysée sèche fut mélangée à une solution salée et la suspension fut injectée au cheval n° 3.423 par la voie intraveineuse.

L'injection précipita une réaction semblable à celles déjà observées. On constata des tremblements musculaires, des respirations rapides, une dépression profonde et une sudation abondante.

Avant la dialyse de l'extrait préparé des 15 larves mentionnées plus haut, une petite portion du liquide fut précipitée par de l'alcool à 95 p. 100. Après la séparation des matières solides par filtrage, la solution alcoolique fut évaporée à la température du laboratoire. Le 8 novembre 1915, le résidu desséché, suspendu dans de l'eau salée, fut injecté dans le cheval n° 3.429.

L'injection fut suivie par une réaction typique.

Le 18 novembre 1915, les matières non dialysées pareillement suspendues dans une solution furent injectées au même

sujet (n° 3.429) par la voie intraveineuse. Une réaction nette, mais très passagère, fut constatée.

II. — 99 jeunes larves d'une espèce de *Gastrophilus* indéterminée furent broyées et macérées dans de l'eau salée pendant 48 heures, à la température de la glacière. Après l'addition d'un peu d'eau distillée, la suspension fut passée à travers un Berkefeld et dialysée pendant 8 jours à froid. Au bout de ce temps les matières dialysées, ainsi que les matières non dialysées, furent desséchées rapidement à la température du laboratoire.

Le 24 novembre 1915, le cheval n° 3.423 reçut par injection intraveineuse les matières dialysées desséchées, suspendues dans de l'eau salée. Dans l'espace de 2 minutes après l'injection, le sujet montra une vive réaction ; la fréquence respiratoire s'augmenta; la diaphorèse et l'expulsion des matières fécales se manifestèrent. Le sujet mourut en 40 minutes après l'injection.

A l'autopsie, on constata le cœur rempli de sang liquide et d'une couleur foncée. L'endocarde était ecchymosé, tandis que le myocarde présentait une couleur très foncée. Les poumons étaient imparfaitement contractés; ils étaient gonflés et congestionnés. Le foie aussi était gorgé d'un sang goudronneux. La rate, qui pesait 5 livres, avait une couleur foncée, mais sa structure était apparemment normale.

Les intestins montrèrent des ecchymoses sous-péritonéales qui étaient surtout nettes dans la proximité des ganglions mésocoliques. Par endroits, il y avait des hémorragies réelles dans les parois intestinales. L'estomac était le siège d'une gastrite sévère de la portion pylorique.

Les matières non dialysées, suspendues dans de l'eau salée et injectées, le 24 novembre 1915, au cheval n° 3.429 par la voie intraveineuse ne causèrent aucune réaction.

III. — 20 larves de *Gastrophilus*, développées à moitié ou complètement, recueillies dans l'estomac du cheval n° 3.454, furent broyées et macérées dans de l'eau stérile. La masse macérée fut distribuée dans une série de sacs de collodion, qui auparavant furent soigneusement éprouvés à l'égard de la perméabilité et de l'imperméabilité ; les sacs furent suspendus dans de l'eau distillée stérile et la dialyse fut continuée à froid pendant 4 jours. Les matières dialysées dissoutes dans de l'eau distillée, montant à 500 cent. cubes, furent injectées au cheval n° 3.455, le 25 mars 1916, après l'addi-

tion d'une quantité de chlorure de sodium, suffisante pour rendre la solution isotonique à l'eau salée physiologique de 0,85 p. 100. L'injection fut faite par la voie veineuse et était complète en 8 minutes.

Les résultats suivants furent constatés : après l'injection de 100 cent. cubes de la solution, plus ou moins, le sujet manifesta des tremblements des flancs, qui bientôt s'étendirent à la musculature striée tout entière. Simultanément, il y avait un abaissement net de la tension artérielle et, au bout de 10 minutes après l'injection, une évacuation copieuse. La diaphorèse, d'abord perceptible autour des yeux, s'étendait rapidement sur la robe entière et devint très profuse. Le mucus coula des narines en caillots.

Les évacuations fréquentes continuèrent par intervalles de presque douze minutes et les matières fécales, d'abord solides, se changèrent en écoulements diarrhéiques.

Au bout de trente minutes la pression artérielle s'augmenta légèrement et l'état du sujet s'améliora, quoique la dépression persistât durant plusieurs heures. Sept heures après l'injection, une fréquence du pouls de 66 par minute fut encore constatée.

Le 26 mars 1916, le pouls, avec une fréquence de 60 par minute, était très faible et les respirations étaient visiblement augmentées. Le sujet était déprimé et l'appétit manquait. Le lendemain le pouls montra encore une fréquence de 60 par minute; la dépression générale était plus évidente et l'appétit avait entièrement disparu.

Le 28 mars 1916, le cheval était étendu par terre et ne pouvait plus se lever; l'épuisement extrême de l'animal nous força à le tuer.

Parmi les lésions décelées par l'autopsie nous constatâmes les suivantes : le foie était très friable et montrait une dégénérescence graisseuse. La rate présentait une parenchyme parsemée d'hémorragies. La section du cœur révélait quelques ecchymoses sous-endocardiques. Les reins étaient friables et mettaient en évidence une néphrite aiguë. La muqueuse gastrique était marquée d'un nombre de taches hémorragiques de la grandeur d'une pièce de 5 francs. Les intestins présentaient des hémorragies diffuses, sous-séreuses et intramusculaires. L'urine se montra albumineuse.

IV. — Le 14 avril 1916, le cheval n° 3565 reçut par la voie veineuse une injection de 150 cent. cubes de la portion non dialysable d'un extrait de *Gastrophilus* préparé comme il suit :

Vingt grosses larves furent macérées dans de l'eau distillée et mises dans des sacs de collodion, soigneusement éprouvés et qui furent suspendus dans de l'eau pure. La dialyse continua durant trois semaines et pendant ce temps l'eau autour des sacs fut changée trois fois.

Les matières non dialysées en solution furent passées à travers un Berkefeld. La filtration achevée, nous ajoutâmes du chlorure de sodium en quantité suffisante pour rendre la solution isotonique à celle de 0,85 p. 100.

A 10 h. 27 du matin : l'injection commença et fut finie en 2 minutes.

A 10 h. 29 : à la terminaison de l'injection, la fréquence du pouls s'éleva de 44 à 56 par minute.

A 10 h. 31 : tremblements musculaires aux flancs. Le sujet devint très inquiet.

A 10 h. 33 : le pouls était très faible. Il n'était plus possible de compter la fréquence par raison de l'inquiétude du sujet.

A 10 h. 37 : le sujet était très agité, marchait continuellement et éternuait sans interruption.

A 10 h. 39 : pouls 72 par minute et très faible défécation. La sueur perlait autour des narines, derrière les oreilles et sur le fourreau.

A 10 h. 42 : diaphorèse générale. Le pouls 90 par minute et à peu près imperceptible.

A 10 h. 45 : la sueur coulait des portions déclives du corps. Larmoiement excessif.

A 10 h. 50 : pouls 84 par minute et un peu plus fort. Tous les phénomènes décrits diminuaient.

Pendant le reste du jour le sujet était dans la stupeur et profondément déprimé. Le lendemain l'animal fut trouvé à terre et n'ayant pas la force de se lever, il fut saigné à mort. Voici l'état relevé par l'autopsie :

La muqueuse de la vessie urinaire pour la moitié de son étendue était diffusément hémorragique. Les reins étaient très friables et la néphrite était évidente. La rate montrait plusieurs ecchymoses sous-capsulaires. Le foie était le siège d'une dégénérescence graisseuse. Les poumons étaient légèrement congestionnés. Le cœur se montrait mou et flasque en présentant des hémorragies sous-endocardiques, spécialement dans le ventricule gauche. Les couches muqueuses et musculaires des intestins étaient nettement congestionnées. Les ganglions lymphatiques viscéraux se montraient légèrement gonflés à l'exception des groupes gastriques qui étaient hémorragiques partout. Le péritoine était visiblement congestionné. L'urine montrait de l'albumine et de l'hémoglobine.

V. — Le 1er mai 1916, 25 larves de *Gastrophilus*, recueillies de l'estomac du cheval n° 3.455 furent broyées et macérées dans 150 cent. cubes d'eau distillée, plus ou moins. Au bout de la macération le mélange fut mis dans des sacs de collodion, qui furent suspendus dans de l'eau coulante d'une température, de 12° à 16°C., pendant une semaine.

Le 8 mai 1916, les matières contenues dans les sacs furent passées à travers un filtre Berkefeld en ajoutant une quantité de chlorure de sodium, suffisant à rendre la solution isotonique à celle de 0,85 p. 100. La solution filtrée fut injectée par la voie veineuse au cheval n° 3.584.

Voici les détails de l'expérience :

Avant l'injection, qui était complète à 4 h. 50 de l'après-midi, le sujet montrait un pouls, fort et plein, de 36 par minute. Respirations, 10 par minute.

A 4 h. 55 : défécation. Les excréments étaient liquides mélangés de crottins.

A 4 h. 58 : la diaphorèse se manifestait aux régions des cuisses.

A 5 heures : défécation. Excréments aqueux. Péristaltisme violent. Coliques légères.

A 5 h. 2 : pouls, 70 par minute très faible et irrégulier. Respirations, 15 par minute. Sudation générale, mais pas profuse.

A 5 h. 5 : évacuation fécale, abondante et aqueuse. Pouls, 70 par minute, faible.

A 5 h. 10 : pouls, 75 par minute, très faible et irrégulier. La sudation s'augmentait. La sueur coulait des portions déclives du corps. Défécation aqueuse et profuse.

A 5 h. 15 : pouls, 63 par minute. La diaphorèse s'abaissait.

A 5 h. 25 : pouls, 60 par minute, faible. Respirations, 12 par minute. La sudation avait cessé.

A 5 h. 30 : Le sujet couché.

Le 9 mai 1916, à 8 heures du matin : température, 39°1 C. Pouls, 64 par minute, faible. Appétit faible.

A 6 heures du soir : température, 40°2 C. Pouls, 72 par minute, faible. L'appétit manquait.

Le 10 mai 1918 : à 8 heures du matin : température, 37°4 C. Pouls, 50 par minute. Le cheval était à terre et n'avait plus la force de se lever; il fut tué par un coup de feu.

L'autopsie révéla les lésions suivantes : le cœur présentait des pétéchies et ecchymoses sous-endocardiques. L'un des poumons montrait une suffusion hémorragique probablement produite par la stase. Les intestins présentaient plusieurs hémorragies sous-séreuses et intramusculaires de la grandeur d'une tête d'épingle jusqu'à celle d'un pois. La muqueuse était tachetée de plusieurs pétéchies.

D. — *Action des extraits alcooliques et acétonés.*

Vingt larves de *Gastrophilus* indéterminées furent broyées, desséchées à la température du laboratoire et macérées pendant 10 jours par de l'alcool concentré. La moitié du liquide alcoolique fut desséchée et suspendue dans de l'eau salée et injectée au cheval n° 3.454, le 10 décembre 1915. Aucune réaction ne fut observée.

Vingt larves de *Gastrophilus* indéterminées furent broyées, desséchées à la température du laboratoire et traitées par de l'acétone pendant 10 jours. La moitié du liquide acétonique fut évaporée et le résidu fut suspendu dans de l'eau salée et injecté au cheval n° 3.455, le 10 décembre 1915. L'injection ne fut pas suivie d'une réaction perceptible.

E. — *Action de la chaleur sur le poison des Oestres.*

I. — Quatre-vingt-dix larves de *Gastrophilus* (n° 3.444), recueillies dans les environs de Chicago, furent divisées en 2 lots, broyées et macérées dans de l'eau salée pendant 72 heures à la température de la glacière.

Les extraits furent filtrés à travers le Berkefeld et l'un d'eux soumis à la chaleur stérilisante (99° C.) pendant 1 heure et les matières précipitées éliminées par la filtration ordinaire.

Des échantillons des 2 lots furent soumis à l'épreuve dans le but de déterminer le contenu albumineux. Voici les résultats :

RÉACTIF	EXTRAIT CRU	EXTRAIT CHAUFFÉ
Biuret	Positif rouge violet	Négatif.
Xantho-protéine	Na-jaune, NH^3-orangé . . .	Négatif.
Millon	Positif	Négatif.
Soufre	Négatif	Négatif.
Molisch.	Positif	Positif.
Adamkieviez	Négatif.	Négatif.
Liebermann.	Négatif	Négatif.

Le 1er décembre 1915, le cheval n° 3.429 reçut une injection intraveineuse de 30 centimètres cubes de l'extrait cru. 6 minutes après l'achèvement de l'injection le sujet manifesta une dépression nette et la fréquence respiratoire s'augmenta. On constata un accroissement du péristaltisme intestinal amenant 4 évacuations fécales. Il n'y avait pas de sudation et 42 minutes après l'injection, le cheval retrouva son état normal.

II. — L'extrait chauffé fut injecté au cheval n° 3.452, le 9 décembre 1915, par la voie intraveineuse. Le résultat de l'injection consista en une respiration haletante durant quelques minutes.

III. — Le reste de l'extrait cru fut aussi injecté au cheval n° 3.452, le 10 décembre 1915, et l'injection fut suivie d'une réaction pareille à celle du jour antérieur.

Apparemment la réceptivité du cheval n° 3.452 à l'égard des substances gastrophiliques était moins évidente que chez celle de nos autres chevaux d'expériences.

IV. — Trente larves de *Gastrophilus* indéterminées (n° 3.635) furent broyées et macérées dans de l'eau salée pendant 16 heures à la température de la glacière. L'extrait fut exposé à une chaleur stérilisante durant 1 heure et filtré après le chauffage.

Le 14 juillet 1916, à 10 h. 55 du matin, les matières filtrées furent injectées par la voie veineuse au cheval n° 3.616. Voici les résultats :

A 11 heures : sudation profuse, salivation, larmoiement, écoulement nasal muqueux, défécation, violents efforts expulsifs abdominaux.

A 11 h. 25 : respiration laborieuse, le sujet tomba à terre et bientôt montra des convulsions tétaniques.

A 11 h. 32 : défaillance respiratoire.

A 11 h. 35 : la mort.

L'autopsie révéla tous les organes nettement congestionnés en montrant çà et là des suffusions hémorragiques. Les muqueuses et les séreuses présentaient des engorgements. La gastrite et l'endocardite étaient fortement marquées. Il n'y avait pas d'albumine dans les urines.

V. — Trente larves d'une espèce de *Gastrophilus* indéterminée (n° 3.635), broyées, furent extraites à froid pendant 16 heures dans de l'eau salée. L'extrait fut chauffé à 99° C. pendant 1 heure. Les matières précipitées par la chaleur furent séparées par la centrifugation et la filtration et lavées soigneusement dans de la solution salée physiologique prise en suspension en 75 cent. cubes, elles furent injectées au cheval n° 3.626, le 14 juillet 1916, à 11 heures du matin.

La réaction suivante se déclara assez lentement :

A 11 h. 15 : sudation légère. Respiration accélérée. Le sujet se montrait inquiet.

A 11 h. 18 : le sujet trempé de sueur. Tous les phénomènes usuellement précipités par l'injection des extraits gastrophiliques devinrent plus intenses.

A 11 h. 20 : le cheval se coucha et se montra très malade.

A 1 h. 25 : l'animal se leva. Assez faible. Pouls rapide. État d'inquiétude durant quelques heures.

A 6 heures : le sujet en état normal, à l'exception de la température qui monta à 40° C.

Le cheval continua en bonne santé.

Le 22 juillet 1916, ce sujet reçut dans l'estomac un extrait préparé de 135 larves de *Gastrophilus nasalis* (n° 3.639). Aucune réaction ne suivit.

Le 17 août 1916, le cheval reçut par la voie veineuse 50 cent. cubes d'une solution saturée de phosphine préparée par M. le Dr Maurice Dolt. Aucune réaction ne se manifesta.

Le 18 août 1916, 75 cent. cubes d'un extrait de 15 larves de *Gastrophilus nasalis* (n° 3.667) furent injectés à ce cheval par la voie veineuse. L'injection, complète à 10 h. 45 du matin, amena les résultats suivants :

A 10 h. 48 : défécation. Le sujet très excité. Coliques.

A 10 h. 50 : diaphorèse profuse. Le sujet manifestait des douleurs abdominales violentes.

A 10 h. 52 : le cheval tomba à terre. Défaillance cardiaque et dyspnée.

A 11 heures : la mort.

L'examen du cadavre montra l'engorgement des reins. La rate était tachetée de plusieurs hémorragies sous-capsulaires. Les poumons étaient fortement gonflés et légèrement congestionnés. Le cœur montrait des hémorragies sous-endocardiques très marquées. Il y avait une gastrite sévère. Les intestins étaient fortement congestionnés.

VI. — Le 16 août 1916, le sujet n° 3.657 reçut une injection intraveineuse de 55 cent. cubes d'un extrait préparé de 10 larves de *Gastrophilus nasalis* (n° 3.667) et chauffé pendant 1 heure à 99°C.

Au moment de l'injection (4 h. 5 de l'après-midi) la fréquence du pouls montait à 52 par minute et sa qualité était assez faible.

A 4 h. 15 : larmoiement léger. Hypersécrétion des muqueuses respiratoires. Défécation normale.

A 4 h. 25 : sudation légère. Secousses faibles des muscles faciaux, pectoraux et abdominaux.

A 4 h. 40 : le sujet s'excita. La diaphorèse s'augmenta un peu. Pouls, 58 par minute et plus faible.

A 5 heures : sudation croissante. Évacuation de fèces semi-liquides. L'animal se montra plus inquiet.

A 5 h. 15 : évacuation liquide. La sueur commença à couler.

A 5 h. 35 : l'intensité de la réaction s'accrut. La diaphorèse était plus profuse et la sueur coulait du corps.

A 5 h. 55 : pouls, 66 par minute et plus faible. L'état présignalé persistait.

Quand le sujet fut observé 14 heures plus tard, il présenta une

apparence normale. Pendant les 2 mois suivants, on constata, le 28 août, une élévation de la température à 36°6 C.; le 28 septembre, à 38°8 C. et le 29 septembre, à 39° C.

L'autopsie ne montra aucune lésion importante.

F. — *Action urticariante du poison.*

Vingt-quatre larves de *Gastrophilus equi* (n° 3.681) furent mises dans de l'eau salée et placées dans l'étuve à 37°5 C. pendant 24 heures. Au bout de ce temps la solution fut transvasée, filtrée et mise à la glacière. Cette opération fut répétée jusqu'à ce que les excrétions larvaires de 72 heures furent recueillies et mélangées.

Le 28 août, à 3 h. 20 de l'après-midi, le mélange fut injecté par voie veineuse au cheval n° 3.663.

Voici les résultats :

A 3 h. 25 : le cheval se montra agité.

A 3 h. 28 : le pouls s'accéléra. Légère sudation aux régions scapulaires.

A 3 h. 30 : défécation.

A 3 h. 35 : les premiers signes d'une urticaire se déclarèrent. Tremblements musculaires.

A 3 h. 40 : les tremblements devinrent généraux et frappants. Pouls, 85 par minute et très faible. L'urticaire se manifestait d'une façon éclatante.

A 3 h. 50 : évacuation semi-liquide.

A 4 heures : pouls, 96 par minute et à peu près imperceptible.

A 4 h. 30 : le pouls s'améliora un peu, 85 par minute. En 10 minutes il y eut 3 évacuations aqueuses.

Dans ce cas il n'y avait ni de diaphorèse, ni de larmoiement et ni d'écoulement muqueux, mais les effets sur les tissus musculaires étaient très marqués. Aux régions où la peau est normalement ridée, celle-ci fut resserrée en sillons solides et profonds, particulièrement sur les parties couvertes par le peaucier. L'urticaire persistait durant le temps d'observation.

Le sujet, atteint d'une arthrite douloureuse, fut tué le 13 septembre 1916. Pendant sa vie il ne montrait pas de réaction fébrile. Les résultats de l'autopsie furent négatifs.

G. — *Action du poison sur le système circulatoire.*

I. — Le 28 août 1916, l'extrait de 18 larves de *Gastrophilus equi* fut injecté intraveineusement au cheval n° 3.678, pendant que le sujet était anesthésié par le chloroforme, afin d'obtenir un tracé kymographique de la tension artérielle et de l'action cardiaque (tracé n° I). Le sujet succomba à l'injection en 40 minutes. L'autopsie révéla des hémorragies sous-endocardiques et 1 gastrite sévère. Tous les ganglions lymphatiques étaient plus ou moins hyperémiés.

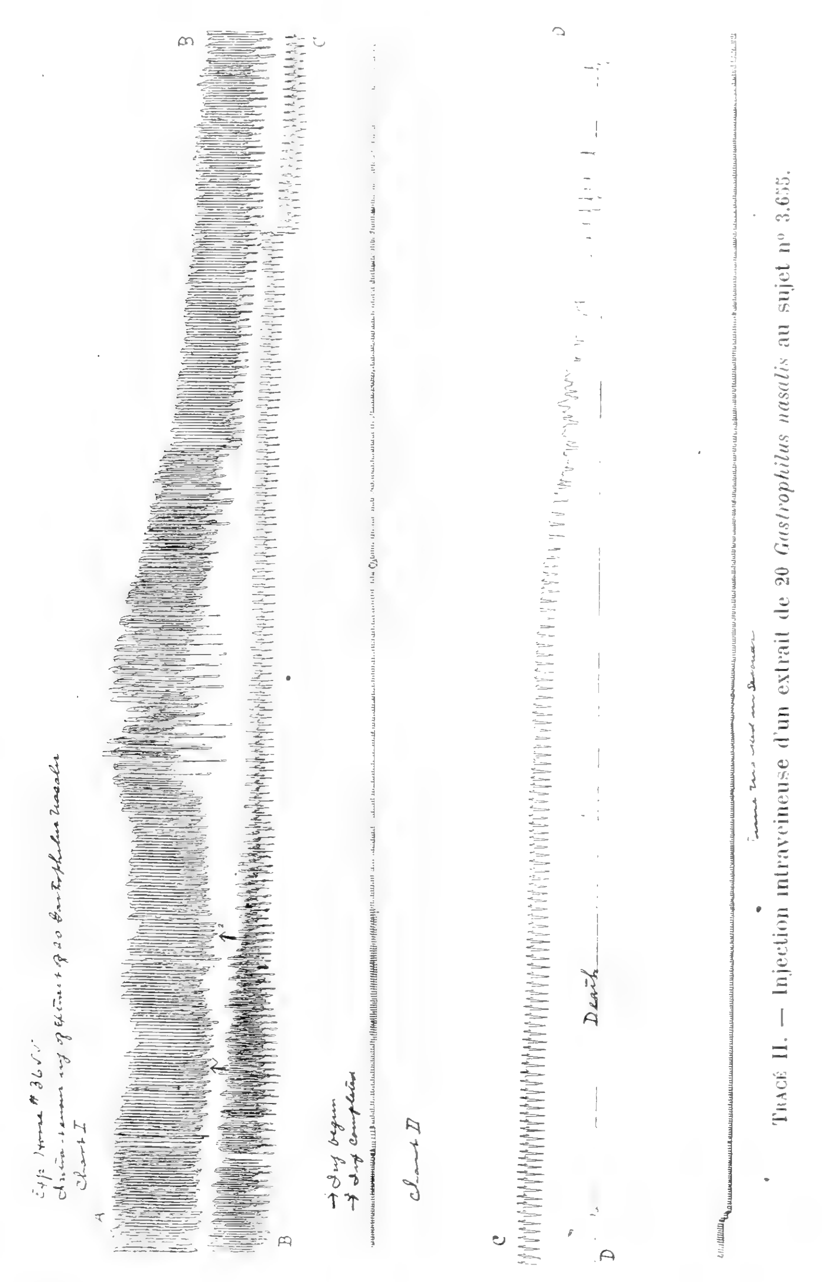
II. — Le 23 août 1916, le sujet n° 3.655, soumis à l'action anesthésique du chloroforme, reçut une injection intraveineuse de 75 cent. cubes d'un extrait préparé de 20 larves de *Gastrophilus nasalis*. Il résulta une sudation,

TRACÉ I. — Injection intraveineuse d'un extrait de 18 *Gastrophilus equi* au sujet n° 3.678.

Injection commencée à 10 h. 34 du matin (Chart I). Inscription interrompue à 10 h. 58 et reprise (Chart II) à 11 heures.

Nota. — Sur les quatre tracés :

Times marked in seconds = Temps marqué en secondes.
Normal Blood Pressure Tracing = Tracé de la pression artérielle normale.
→[1] *Inj. begun* = Commencement de l'injection. | →[2] *Inj. completed* = Fin de l'injection.
Death = Mort.



TRACÉ II. — Injection intraveineuse d'un extrait de 20 *Gastrophilus nasalis* au sujet n° 3.655.

tandis que les effets sur les fonctions circulatoires furent enregistrées par le kymographe (tracé n° II).

A l'autopsie on constata des hémorragies sous-capsulaires de la rate. Le cœur montra quelques pétéchies et ecchymoses endocardiques. Il y avait une gastrite nette, la muqueuse gastrique montrant quelques ulcères apparemment d'une origine antérieure.

L'analyse de l'urine montra l'albumine.

Tracé III. — Injection intraveineuse d'un extrait de 20 *Gastrophilus equi* au sujet n° 3.625.

III. — Le sujet 3.625, utilisé pendant quelques mois dans une expérience antérieure, fut chloroformisé le 7 novembre 1916 et reçut par injection intraveineuse un extrait salé de 20 larves de *Gastrophilus equi* (n° 3.755). La réaction circulatoire fut enregistrée par le kimographe (tracé n° III).

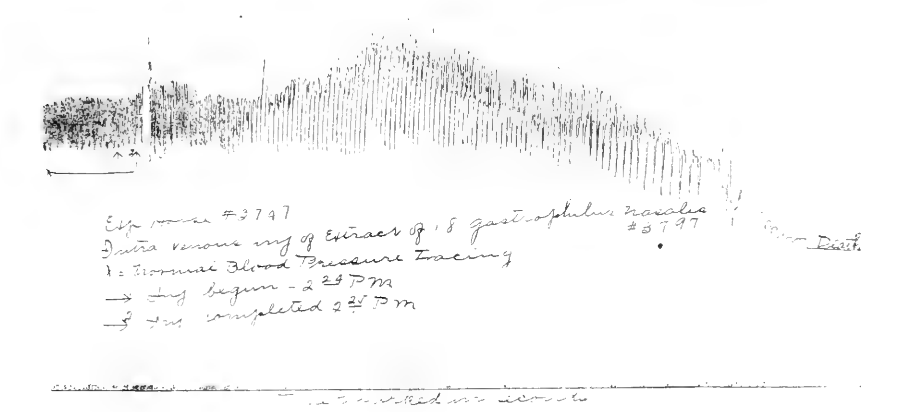
En tant que les symptômes ne furent pas masqués par l'anesthésie, ils ressemblèrent à ceux constatés antérieurement. L'injection provoqua un collapsus rapide et la mort arriva en 17 minutes.

Les lésions principales, révélées par l'autopsie, étaient : congestions des reins, un haut degré de gonflement pulmonaire et hyperémie de la muqueuse gastrique.

IV. — Le 29 décembre 1916, le cheval 3.747 soumis à l'action anesthésiante du chloroforme fut injecté par la voie veineuse

d'un extrait de 18 larves de *Gastrophilus nasalis* et préparé à la manière usuelle. La réaction circulatoire enregistrée par le kymographe (tracé IV) causa la mort en quelques minutes.

L'autopsie révéla congestion et ecchymoses sous-endocardiques. Les poumons montrèrent un gonflement extrême. Il



Tracé IV. — Injection intraveineuse d'un extrait de 18 *Gastrophilus nasalis* au sujet n° 3.797.

y avait congestion de la muqueuse gastrique près du pylore. L'urine ne contenait rien d'anormal.

III

POISON DES ŒSTRES ET ANÉMIE INFECTIEUSE

I. — Afin de déterminer s'il est possible ou non de provoquer une anémie, le sujet 3.742 reçut une injection quotidienne d'un extrait d'une larve de *Gastrophilus equi*. L'examen du sang avant l'expérience révéla : globules rouges, 7.590.000; hémoglobine, 90 p. 100.

Les 4 premières injections, commencées le 4 novembre 1916, furent faites sous la peau et provoquèrent une inquiétude passagère. Comme les injections sous-cutanées avaient causé un abcès, celles qui suivirent furent faites par la voie veineuse.

Le 10 novembre 1916. État normal : pouls, 36 par minute.

Respirations, 20 par minute. Température, 37°8 C. Injection à 3 h. 25 de l'après-midi, suivie d'inquiétude et défécation. A 4 heures : pouls, 40 par minute. Respirations, 32 par minute. A 5 h. 30 : pouls, 60 par minute et très faible. Respirations, 28 par minute. Température, 39°1 C.

Le 11 novembre. État normal : pouls, 42 par minute. Respirations, 18 par minute. Température, 38° C. Injection à 11 h. 15 du matin. Nulle réaction ne fut observée.

Le 12 novembre. État normal : pouls, 39 par minute. Respirations, 22 par minute. Température, 38°1 C. Injection à 11 h. 20 du matin. Il n'y avait pas de résultats visibles.

Le 13 novembre. État normal : pouls, 39 par minute. Respirations, 18 par minute. Température, 37°7 C. A 2 h. 30 de l'après-midi, injection qui ne causa aucune réaction.

Le 14 novembre. État normal : pouls, 36 par minute. Respirations, 18 par minute. Température, 37°7 C. Injection à 2 h. 57 de l'après-midi.

A 3 h. 2 : la fréquence respiratoire s'accéléra. Le sujet se raidit, tomba à terre et resta couché pendant 15 minutes. Bientôt après la chute, le pouls, assez fort, monta à 70 par minute, mais, dans le quart d'heure suivant, devint plus lent et très faible. Il y avait trois évacuations fécales et la musculature volontaire montra des tics légers et passagers. Température, 37°7 C. Après quelque temps, l'animal reprit l'état normal.

Le 15 novembre. État normal : pouls, 36 par minute. Respirations, 20 par minute. Température, 38° C. Injection à 4 h. 20 de l'après-midi.

A 4 h. 23 : le sujet devint agité et commença à chanceler. La musculature montra une raideur tétanique. Le cheval tomba à terre et le pouls gagna en volume et en fréquence, 80 par minute. En 10 minutes, le pouls devint à peu près imperceptible et continua très rapide. Évacuations fécales et flatulentes.

A 5 heures : le sujet se leva et, à l'exception d'un pouls assez faible, se trouva apparemment normal.

Le 16 novembre. État normal : pouls, 42 par minute. Respirations, 22 par minute. Température, 37°1 C. Injection à 3 h. 22 de l'après-midi.

A 3 h. 25 : le sujet devint raide, vacilla et tomba à terre, tandis que la musculature entière fut saisie de spasmes tétaniques. Pouls, 120 par minute. Le cœur battit à tout rompre et les battements furent entendus à une distance considérable. Évacuations fécales et flatulentes.

A 3 h. 30 : pouls, 55 par minute et faible.

A 3 h. 35 : le sujet se leva et, à part une faiblesse du pouls assez marquée, se montra en état normal. Globules rouges, 5.256.000. Hémoglobine, 88 p. 100.

Le 17 novembre. État normal : pouls, 36 par minute. Respirations, 24 par minute. A 3 h. 13 de l'après-midi : injection de l'extrait gastrophilique. Après une minute, le sujet devint très inquiet et fut saisi de contractures musculaires tétaniques. Il y avait de la rigidité et du trismus. Deux minutes après l'injection, le cheval tomba à terre. La dyspnée survint brusquement et fut accompagnée d'efforts expulsifs abdominaux qui menèrent au rejet des urines. Le pouls devint imperceptible et la mort survint 6 minutes après l'injection.

L'examen du cadavre ne révéla rien d'important, à l'exception d'un léger degré de gonflement pulmonaire.

II. — Le cheval n° 3.768 reçut quotidiennement une injection intraveineuse préparée d'une larve de *Gastrophilus nasalis*, afin de constater les résultats à l'égard de la production éventuelle d'une anémie. Au commencement de l'expérience, l'examen du sang montra : globules rouges, 6.377.000.

La première injection eut lieu le 5 décembre 1916, et celle-ci, comme les trois qui suivirent, ne provoquèrent aucune réaction.

Le 9 décembre : injection finie à 9 h. 45 du matin. A 10 h. 5 : légers tremblements musculaires et un écoulement de mucosités nasales. A 10 h. 15 : écoulement muqueux fortement marqué. A 11 heures : la réaction cessa.

Le 10 décembre : l'injection ne provoqua aucune réaction.

Le 11 décembre : l'injection causa un léger écoulement nasal et accéléra la fréquence respiratoire. Globules rouges : 6.900.000.

Le 12 décembre : injection à 11 h. 30. A 11 h. 35 : écoulement muqueux des narines. Accélération respiratoire. A

11 h. 40 : le sujet devint inquiet et respira rapidement. Défécation. A 11 h. 50 : l'animal revint à l'état normal.

Le 13 décembre : injection complétée à 11 h. 30. A 11 h. 35 : le sujet fut agité, respira avec vitesse et montra des tremblements légers. Écoulement nasal inconsidérable. A 11 h. 50 : l'animal respira rapidement, mais autrement parut normal.

Le 14 décembre : injection finie à 2 h. 31 de l'après-midi. Après une minute, le sujet devint inquiet et les mouvements respiratoires augmentèrent. Le cheval, montrant des spasmes tétaniques, chancela et tomba à terre exactement 4 minutes après l'injection. Il s'étendit avec les membres raides. La fréquence et le volume respiratoires furent fortement augmentés. Le pouls, très vite, se montra presque imperceptible.

A 3 h. 40 : la respiration acquit un caractère dyspnéique. Rejet muqueux des narines. Défécation. A 3 h. 50 : les respirations furent plus rapides, 74 par minute. Le sujet se posa sur la poitrine. A 4 h. 30 : le cheval, après un vain effort pour se lever, s'étendit de nouveau. Respirations, 50 par minute. A 4 h. 40 : les respirations devinrent très rapides et le pouls, aussi accéléré, s'affaiblit d'une façon alarmante. A 4 h. 50 : l'asphyxie survint, et à 4 h. 55 : la mort.

L'autopsie révéla une hémorragie extensive dans le bassin, dont la source resta indéterminée. Le poumon droit était hémorragique, tandis que le reste du tissu pulmonaire était parsemé d'hémorragies de la grandeur d'une tête d'épingle. Le cœur présentait des suffusions hémorragiques sous-endocardiques assez étendues.

Comme on peut le constater, les expériences sur ces deux derniers chevaux étaient projetées dans le but de déterminer la possibilité de provoquer une anémie par des injections gastrophiliques répétées. Tandis que les injections ainsi pratiquées se montrèrent très nocives, nous arrivâmes à sauvegarder notre prochain sujet (n° 3.798), en mettant des intervalles plus longs entre les injections, aussi bien que par l'usage de petites doses désensibilisatrices, suivant la méthode de Besredka [7].

Expérience sur cheval n° 3798.

DATES — (1917)	MATIÈRES INJECTÉES	RÉSULTATS	GLOBULES ROUGES	Hémoglobine p. 100
3 janvier	1 larve de *G. nasalis*.	Aucun.	6.250.000	85
6 janvier	1 larve de *G. nasalis*.	Legère augmentation respiratoire.	»	»
10 janvier	1 larve de *G. nasalis*.	Aucun.	»	»
15 janvier	2 larves de *G. nasalis*.	Réaction nette durant 10 minutes.	6.570.000	80
22 janvier	1 larve de *G. nasalis*.	Réaction.	»	»
29 janvier	1 larve de *G. nasalis*.	Réaction très légère.	6.818.000	»
5 février	1 larve de *G. nasalis*.	Réaction légère.	8.107.000	85
12 fèvrier	1 larve de *G. nasalis*.	Réaction légère.	7.922.000	90
19 février	1 larve de *G. nasalis*.	Aucun.	7.428.000	90
26 février	2 larves de *G. nasalis*.	Aucun.	7.786.000	85
2 mars..	»	»	7.160.000	85
5 mars..	3 larves de *G. equi*.	Réaction légère.	7.411.000	85
12 mars..	3 larves de *G. equi*.	Réaction légère.	»	»
19 mars..	4 larves de *G. equi*.	Réaction.	5.681.000	85
2 avril ..	5 larves de *G. equi*.	Réaction très légère.	5.296.000	75
9 avril ..	5 larves de *G. equi*.	Aucun.	»	»
16 avril ..	5 larves de *G. equi*.	Réaction très légère.	5 885 000	70
23 avril ..	5 larves de *G. equi*.	Réaction très légère.	6.944.000	80
30 avril ..	5 larves de *G. equi*.	Aucun.	5.821.000	75
7 mai ...	5 larves de *G. equi*.	Aucun.	5.925.000	80
14 mai ...	7 larves 1/2 de *G. equi*.	Réaction légère.	»	»
21 mai ...	7 larves 1/2 de *G. equi*.	Aucun.	»	»
24 mai ...	»	»	5.614.000	80
28 mai ...	10 larves de *G. equi*.	Réaction.	5.903.000	80
4 juin ...	10 larves de *G. equi*.	Aucun.	»	»
7 juin ...	»	»	5.251.000	80

Le 7 juin le sujet fut trouvé à terre et n'ayant plus la force de se lever, il fut tué par un coup de feu.

L'autopsie ne révéla rien d'important à l'exception d'une albuminurie bien prononcée.

Expérience sur cheval n° 3814.

En même temps, nous traitâmes un autre cheval (n° 3814) par des injections de blanc d'œuf (voir le tableau ci-dessous), pour la raison que la nature anaphylactique des réactions déjà obtenues nous sembla évidente.

Le 12 juin ce sujet reçut une injection d'un extrait gastrophilique, employé dans une autre expérience afin de déterminer sa toxicité pour un cheval âgé. Une forte réaction se

DATES — (1917)	INJECTION de BLANC D'ŒUF	RÉSULTATS	GLOBULES ROUGES	HÉMO-GLOBINE p. 100
10 janvier...	»	»	7.500.000	90
13 janvier...	5 c.c.	Aucun.	»	»
18 janvier...	3 c.c.	Aucun.	»	»
22 janvier...	2 c.c.	Aucun.	»	»
26 janvier...	1 c.c.	Réaction légère.	»	»
29 janvier...	»	»	7.602.000	90
31 janvier...	1 c.c.	Réaction très légère.	»	»
4 février...	1 c.c.	Aucun.	»	»
5 février...	»	»	7.607.000	80
12 février...	1 c.c.	Réaction très légère.	8.414.000	85
19 février...	1 c.c.	Aucun.	7.870.000	90
26 février...	1 c.c. 2	Réaction nette.	8.214.000	85
5 mars	»	»	7.320.000	85
12 mars	1 c.c. 5	Aucun.	6.580.000	85
19 mars	2 c.c.	Aucun.	8.222.000	85
2 avril	3 c.c.	Aucun.	9.200.000	85
9 avril	4 c.c.	Réaction légère.	9.355.000	90
16 avril	5 c.c.	Réaction.	9.440.000	100
23 avril	5 c.c.	Réaction très légère.	9.885.000	95
30 avril	5 c.c.	Réaction légère.	9.355.000	90
7 mai......	5 c.c.	Aucun.	9.314.000	95
14 mai......	7 c.c. 5	Aucun	»	»
21 mai......	7 c.c. 5	Réaction très légère.	10.207.000	95
28 mai......	10 c.c.	Réaction très légère.	8.470.000	90
4 juin	10 c.c.	Réaction très légère.	»	»
9 juin	»	»	8.311.000	90
11 juin	10 c.c.	Réaction très légère.	»	»

déclara, pendant laquelle le cheval fut tué par un coup de feu. Rien d'important ne fut constaté à l'autopsie.

IV

L'EXTRAIT D'ŒSTRES SERAIT-IL VIRULENT EN MÊME TEMPS QUE TOXIQUE ?

Les expériences suivantes furent entreprises dans l'espoir d'obtenir quelque renseignement sur la possibilité de transmettre une maladie quelconque par le sang ou le sérum des chevaux préalablement injectés avec des matières gastrophiliques.

I. — Au cheval n° 3.043 on injecta 240 cent. cubes de sang frais pris sur le cheval n° 2.162, 112 jours après que celui-ci avait reçu l'injection de l'extrait gastrophilique. Les 9e et 10e jours après l'injection du cheval n° 3.043, sa température haussa jusqu'au 11e jour, où elle atteignit le maximum de

40°2 C. La température baissa le lendemain et devint normale le 13e jour après l'injection, où le sujet fut saigné à mort.

L'autopsie révéla des ecchymoses endocardiques assez nettes et une albuminurie légère.

II. — Le cheval n° 3.090 reçut l'injection de 240 cent. cubes du sérum obtenu du sujet n° 3.043, au jour de sa mort. Le 13e jour après l'injection, la température du sujet augmenta à 39°1 C., atteignant 39°7 C. le lendemain. Rien de plus ne fut constaté pendant les 25 jours que le sujet resta en observation.

III. — Le jour de la mort du cheval n° 2.162, on injecta 240 cent. cubes de son sang au sujet n° 3.103. Entre le 12e et le 16e jour, ce cheval montra une réaction fébrile pendant laquelle la température s'éleva à 41°4 C. Le sujet devint très faible et fut tué par un coup de feu.

L'autopsie montra les ganglions spléniques gonflés et hyperémiques, ainsi que des ecchymoses sous-endocardiques.

IV. — Le sujet n° 3.403 fut saigné au jour de sa mort, soit 8 jours après l'injection fatale des matières gastrophiliques, et 30 cent. cubes de sérum furent injectés au cheval n° 3.413, le 7 octobre 1915. L'injection conduisit aux réactions fébriles suivantes :

DATE	TEMPÉRATURE MATIN	TEMPÉRATURE SOIR	DATE	TEMPÉRATURE MATIN	TEMPÉRATURE SOIR
18 octobre	38,4	39,6	24 novembre	40,1	39,7
19 octobre	38,6	38,1	25 novembre	39	38,7
23 octobre	38	38,8	5 décembre	38,8	39,4
24 octobre	39,6	41,1	6 décembre	40	40,1
25 octobre	39,6	38,7	7 décembre	40,5	40
6 novembre	38,4	38,7	8 décembre	39,4	39,5
7 novembre	39,2	39,5	9 décembre	39	38,3
8 novembre	40	40,2	16 décembre	38,4	39,4
9 novembre	40,2	40,4	17 décembre	39,8	40,2
10 novembre	40,3	40	18 décembre	39,3	39,7
11 novembre	39,4	38	19 décembre	39,1	39,5
22 novembre	39,1	39,7	24 février	40,2	39,4
23 novembre	40,1	40			

On laissa le sujet vivre jusqu'au 25 mars 1916, mais rien de plus ne fut constaté.

V. — Le sujet n° 3.625 reçut 240 cent. cubes de sang frais recueilli du cheval n° 3.422, 247 jours après que celui-ci avait été injecté avec l'extrait d'une larve de *Gastrophilus equi*.

L'injection eut lieu le 16 juillet 1916, et causa des accès fébriles assez faibles :

DATE	TEMPÉRATURE		POULS	
	MATIN	SOIR	MATIN	SOIR
17 juillet	38,1	38,3	33	35
18 juillet	38,2	38,6	34	36
26 juillet	37,8	38,3	33	36
23 août	37,7	38,3	36	36
27 août	38,7	39,1	39	45
28 août	38,3	39,1	39	45
29 août	38,6	38,5	40	39
30 août	37,7	38,3	38	39
4 septembre	38,1	38,3	36	36
12 septembre	38,7	38,3	39	38
14 septembre	37,7	38,4	36	38
16 septembre	37,6	38,3	36	38
17 septembre	37,9	38,4	37	39
18 septembre	38,2	38,4	36	38
19 septembre	38,2	38,4	36	38
20 septembre	38,1	38,6	36	38
24 septembre	37,8	38,6	35	38
28 septembre	37,4	38,3	36	39
29 septembre	38,4	38,8	39	39
30 septembre	37,8	39,1	36	38
5 octobre	38,5	38,4	38	38
8 octobre	37,8	38.3	36	40
12 octobre	38,3	38,5	36	40
15 octobre	37,5	38,5	36	39
16 octobre	39,1	38,5	36	38
17 octobre	38,3	38,3	36	36
18 octobre	38,3	39,2	37	39
23 octobre	37,8	38,3	35	37
24 octobre	38	38,3	35	35
26 octobre	38,7	38,7	36	38
30 octobre	38,2	38,7	38	36

VI. — Le 6 septembre 1916, on pratiqua sur le sujet n° 3.686 une injection sous-cutanée de 240 cent. cubes de sang frais recueilli du cheval n° 3.636 qui avait reçu dans l'estomac, le 22 juillet, l'extrait salé de 39 larves de *Gastrophilus hemorrhoidalis*. Les 25 et 26 septembre, le sujet n° 3.686 montra une

élévation thermique jusqu'à 38°6 C., qui fut encore constatée les 11 et 12 octobre, où le maximum atteignit 40° C.

Le cheval fut tué à l'instant de la dernière réaction et l'examen du cadavre révéla plusieurs ecchymoses et pétéchies sous-endocardiques, mais pas d'autres manifestations.

VII. — Le 13 septembre 1916, 240 cent. cubes de sang frais de cheval n° 3.663 ayant reçu, le 28 août 1916, le liquide d'une macération de 72 heures de 24 larves de *Gastrophilus equi*, fut injecté au cheval n° 3.688.

Comme résultat de l'injection, le sujet manifesta la réaction suivante :

DATE	TEMPÉRATURE		POULS	
	MATIN	SOIR	MATIN	SOIR
27 septembre	38	38,3	39	40
28 septembre	38,1	38,8	39	42
29 septembre	39,6	40	45	54
30 septembre	38,4	38,2	42	44
1er octobre	38	38,4	39	42

Ce cheval fut tué le 2 octobre, par un coup de feu. L'autopsie montra la rate élargie (4 kilogrammes), légèrement indurée et parsemée de plusieurs petites hémorragies sous-capsulaires. Le foie était un peu dur, et dans le cœur on constata quelques ecchymoses endocardiques. Il y avait de l'albuminurie.

* * *

Avec les données expérimentales précitées, il est possible d'examiner les résultats et conclusions de Seyderhelm et de les mieux comprendre.

Un coup d'œil sur nos résultats montre qu'en plusieurs points ceux-ci confirment nettement ce qui fut constaté par les auteurs alsaciens. Les réactions foudroyantes provoquées par les injections des matières gastrophiliques ou d'une solution des substances provenant des larves étaient clairement identiques.

Avec les Seyderhelm, nous pouvions aussi constater le carac-

tère thermostabile des substances intoxicantes. De même nous pouvions observer que le sang des chevaux injectés avec les extraits des larves de *Gastrophilus* provoquait chez des sujets sains des accès fébriles après incubation et que, de plus, le sang ou le sérum d'un tel cheval causait une semblable réaction après l'injection dans un troisième sujet.

D'autre part nous mîmes en évidence la nature dialysable des matières intoxicantes et réussîmes à provoquer une légère réaction par l'introduction d'un extrait gastrophilique directement dans l'estomac.

Au contraire, nos efforts pour provoquer, par des injections uniques ou répétées, une maladie telle que l'anémie infectieuse ou la « fièvre des marais » de nos régions restèrent infructueux.

Avertis par nos résultats aussi bien que par le contraste frappant entre la répartition universelle des *Gastrophilus* et les foyers, plus ou moins limités, de la maladie, nous sommes forcés de rejeter les théories des Seyderhelm sur l'étiologie de l'anémie infectieuse du cheval.

Les fortes réactions qui suivent l'injection des matières gastrophiliques ne permettent point de conclure qu'il existe un rapport étiologique entre les œstres et la maladie. Nous avons vu, d'ailleurs, des réactions aussi nettes provoquées par l'injection des extraits d'autres parasites.

Probablement les Seyderhelm n'avaient pas soupçonné la vraie nature des phénomènes dont ils rendirent témoignage. Avec Carré et Vallée [**8**, **9**], nous rendons hommage à l'originalité de leur théorie et à la logique de leur conception ; mais, forts de nos expériences, nous sommes forcés de rejeter leurs conclusions finales.

Cependant, les travaux de Seyderhelm ne sont pas dépourvus d'importance, car ils enrichissent non seulement nos connaissances sur les poisons parasitaires, mais de plus, ils inspirent des recherches ultérieures.

A cet égard, plus heureux que Carré et Vallée [**8**, **9**], nous n'avons jamais vu manquer les réactions aiguës signalées par les savants alsaciens. Naturellement la question de la nature des réactions obtenues si constamment s'imposa à notre attention.

Voici les hypothèses qui s'offrirent à nous : 1° une toxicité intrinsèque des larves; 2° la présence dans les parasites d'anticorps spécifiquement nuisibles à leurs hôtes; 3° le caractère anaphylactique des réactions, rendu possible par la sensibilisation des hôtes par des invasions parasitaires antérieures.

Nous pouvions rejeter la première hypothèse à cause de la non-toxicité pour les autres animaux, appartenant à diverses espèces et que nous constatâmes à plusieurs occasions. La seconde théorie est probablement écartée par la nature thermostabile des matières intoxicantes et par les réactions qui suivirent les injections des substances excrétées par les larves.

La troisième hypothèse nous semble plus digne d'une considération sérieuse. Ce fut Favero [**10**] qui, le premier, avança l'idée que les intoxications décrites par les Seyderhelm n'étaient que des réactions anaphylactiques. En outre, les réactions observées nous frappaient fortement par leur similitude avec celles décrites comme des phénomènes anaphylactiques chez le cheval par Ciuca [**11**], Briot et Dopter [**12**], Briot et Dujardin-Beaumetz [**13**], Weinberg et ses collaborateurs [**18**].

La possibilité d'une anaphylaxie parasitaire est encore suggérée par l'urticaire, l'intoxication violente et la mort subite constatées après l'effusion dans l'intérieur du corps du liquide des kystes de *Tænia echinococcus* au moment de leur rupture ou de leur ponction.

Le problème d'une anaphylaxie parasitaire nous décida à continuer nos expériences par des méthodes plus exactes.

Dans ce but, nous enregistrâmes les réactions circulatoires au moyen de tracés kymographiques dans les expériences sur les chevaux n°s 3.635, 3.655, 3.678 et 3.749 (*Vide* : tracés I, II, III et IV). Les tracés s'expliquent d'eux-mêmes.

Il nous sembla aussi très utile de mettre en parallèle les symptômes de l'anaphylaxie parasitaire et non parasitaire et la suite des expériences nous montra le rapport qui existe entre les deux types d'intoxication.

V

ANAPHYLAXIE ET POISONS PARASITAIRES

I. — Le cheval n° 3.723 reçut des injections de blanc d'œuf, aux doses respectives de 5, 3, 2 et 1 cent. cubes dissous dans de l'eau salée, à intervalles de 4 ou 5 jours. Les injections ne produisirent aucune réaction, et le sérum du sujet ne contenait pas d'anticorps précipitants contre l'antigène utilisé.

Trois semaines après la dernière injection, le sujet reçut par la voie veineuse une solution de 4 blancs d'œuf et demi dans 900 cent. cubes d'eau salée. L'injection eut lieu le 26 décembre 1916, à 11 h. 2 du matin. Voici les résultats : A 11 h. 3 : après l'injection de près de 100 cent. cubes de la solution albuminée, le sujet devint agité et manifesta un léger degré de rigidité musculaire. A l'instant de l'achèvement de l'injection on constata une inquiétude frappante, une respiration rapide et des tics musculaires.

A 11 h. 6 : le cheval hennit et tomba à terre. Le pouls était à peu près imperceptible et la respiration atteignit une fréquence de 72 par minute. Il y avait des convulsions tétaniques, notamment des muscles fléchisseurs de l'encolure. Efforts expulsifs abdominaux suivis d'évacuation involontaire des urines. La conjonctive était nettement congestionnée.

A 11 h. 8 : le pouls était imperceptible. Respirations, 54 par minute. Les convulsions tétaniques augmentèrent.

A 11 h. 10 : le sujet était clairement à l'agonie, étouffa des soupirs dyspnéiques et voûta l'encolure.

A 11 h. 12 : mort.

L'autopsie révéla une congestion rénale, accompagnée de plusieurs hémorragies sous-capsulaires. Le myocarde montrait une hémorragie très nette. Les poumons étaient congestionnés partout et légèrement gonflés. L'urine contenait de l'albumine.

Quoique les observations déjà citées fortifiassent nos idées sur la nature anaphylactique de l'intoxication gastrophilique, notre thèse ne pouvait être soutenue sans la preuve incontes-

table que les matières intoxicantes sont *per se* inoffensives pour l'espèce chevaline.

Dans ce but, nous projetâmes une série d'expériences sur des chevaux qui n'avaient jamais été sensibilisés par des larves d'œstres.

Il nous sembla parfaitement inutile de chercher de tels sujets parmi les chevaux adultes de nos environs où les œstres sont répandus de façon constante et par conséquent nous acquîmes quelques poulains qui étaient nés après la saison propre à ces insectes.

Quoique les observations de Guyot [**14**] sur la viabilité des œufs gastrophiliques nous fussent bien connues, nous croyions néanmoins que dans notre climat rigoureux les poulains qui étaient nés après le 1er novembre seraient exempts de larves.

La preuve que nous nous trompâmes à cet égard apparaîtra dans les comptes rendus des expériences suivantes :

a) Le poulain n° 3.863, né le 4 novembre 1916, reçut, le 3 mars 1917, par injection intraveineuse, un extrait de 5 larves de *Gastrophilus equi* préparé d'après la méthode usuelle.

Après cette injection, le sujet réagit de la même façon que les chevaux adultes antérieurement observés.

Le poulain fut saigné aussitôt que la réaction nous sembla mortelle.

L'autopsie mit au jour 75 larves de *Gastrophilus equi* bien développées et accrochées solidement à la muqueuse gastrique.

b) Le poulain n° 3.891, né dans la neige pendant le mois de décembre 1916, fut injecté par la voie veineuse le 2 avril, avec un extrait de 5 larves de *Gastrophilus equi*. Une forte réaction, très typique, se déclara et une fois de plus nous trouvâmes dans l'estomac 20 larves de *Gastrophilus equi*.

c) Le sujet n° 3.898, né le 2 février 1917, reçut, le 9 avril 1917, une injection intraveineuse d'un extrait de 5 larves de *Gastrophilus equi*. L'injection était complète à 2 h. 30 de l'après-midi.

A 2 h. 33 : le poulain s'inquiéta, se frotta les naseaux, bondit et montra une fréquence respiratoire augmentée.

A 2 h. 36 : le sujet commença à suer et continuellement se

fourra les naseaux sous la litière. Les respirations augmentèrent de plus et l'animal fut très agité. Il y avait un larmoiement léger.

A 2 h. 40 : le poulain se coucha mais se leva aussitôt et commença à marcher. La diaphorèse resta légère.

A 3 h. 5 : les symptômes s'apaisèrent. Le sujet fut tué par une injection de strychnine après que l'état normal s'était rétabli.

L'autopsie ne montra aucune larve gastrophilique.

d) Le poulain n° 3.906, né le 19 mars 1917, reçut le 13 avril, à 1 h. 21 de l'après-midi, par la voie veineuse un extrait gastrophilique avec les résultats suivants :

A 1 h. 23 : le poulain devint agité, piaffa, secoua la tête et se mit à marcher. Après 2 ou 3 minutes on constata des tremblements musculaires légers aux flancs et le sujet replia les membres postérieurs contre l'abdomen.

A 1 h. 30 : le pouls devint plus faible et la peau plus chaude et plus humide. Il y eut une évacuation de fèces solides qui fut répétée 10 minutes plus tard.

A 1 h. 50 : évacuation de matières fécales demi-solides. Le sujet était un peu agité, se mordit lui-même ainsi que ses compagnons. La respiration augmenta légèrement.

A 2 heures : évacuation de fèces très liquides.

A 2 h. 15 : le poulain se frotta les naseaux et piaffa. Le pouls, 114 par minute, était faible.

A 2 h. 50 : la réaction avait cessé.

e) Le 12 juin 1917, le même sujet avec 2 autres poulains fit part d'une expérience pendant laquelle il reçut à 3 h. 17 de l'après-midi l'injection de 25 cent. cubes d'un extrait à 10 p. 100 préparé de larves de *Gastrophilus equi*.

A 3 h. 20 : le poulain montra une respiration accélérée et une colique légère. Défécation.

A 3 h. 28 : la respiration rapide continua et on constata un écoulement de mucus nasal.

A 3 h. 30 : le sujet eut un accès de toux.

A 3 h. 35 : le poulain continua à respirer rapidement.

A 4 h. 46 : le sujet avait repris l'état normal.

L'animal fut tué tout de suite après la cessation de la réaction. Aucune larve de *Gastrophilus* ne fut rencontrée à l'autopsie.

f) Un poulain sain n° 3.905, né à la fin de février ou au commencement de mars, fut reçu par nous le 11 avril 1917; ce sujet reçut, le 12 juin 1917, une injection intraveineuse de 25 cent. cubes d'un extrait à 10 p. 100 de larves de *Gastrophilus equi*. Nulle réaction ne suivit.

Trente-sept minutes plus tard, on injecta, aussi par la voie veineuse, 25 cent. cubes d'un extrait à 10 p. 100 de larves de *Gastrophilus nasalis*. Aucune réaction ne fut constatée.

L'autopsie, faite le lendemain, ne révéla aucune larve d'œstre.

g) Le poulain n° 3.904, né à la fin de février ou au commencement de mars, fut reçu à la station le 11 avril 1917.

Le 12 juin 1917, ce sujet reçut dans les veines 25 cent. cubes d'un extrait à 10 p. 100 de larves de *Gastrophilus equi*. L'injection ne provoqua aucune réaction.

Trente-sept minutes plus tard, le poulain reçut une injection semblable de 15 cent. cubes d'un extrait à 10 p. 100 préparé avec des larves de *Gastrophilus hemorrhoidalis*. Aucune réaction ne se déclara.

Le poulain fut tué le lendemain, et à l'autopsie aucune larve de *Gastrophilus* ne fut trouvée.

h) Afin de vérifier la propriété intoxicante de l'extrait gastrophilique employé dans les expériences sur les poulains 3.906, 3.905 et 3.904, un cheval âgé, n° 3.814, qui nous avait servi dans une expérience antérieure, reçut, le 12 juin 1917, une injection de 25 cent. cubes du même extrait à 10 p. 100 de *Gastrophilus equi*.

Une réaction foudroyante se déclara pendant laquelle le sujet fut tué par un coup de feu.

Lorsque nous nous rendons compte des résultats des expériences sur les poulains précités et que nous les soumettons à l'analyse, il nous semble que les réactions fortes obtenues dans les sujets n° 3.863 et n° 3.891 n'étaient que les conséquences de la sensibilisation par les larves gastrophiliques que ces animaux hébergeaient. Incidemment ces recherches montrèrent que les œufs des œstres ou leurs embryons continuent à être dans un état viable pendant une longue période après que les mouches n'existent plus, comme Guyot [**14**] l'avait constaté antérieurement.

La réaction précipitée dans le poulain n° 3.898 était plus inexplicable, parce qu'aucune larve ne fut trouvée dans cet animal. Il nous sembla que trois possibilités étaient à considérer : un principe nuisible des larves *sui generis* : une sensibilisation active à cause des larves minuscules qui restaient inobservées, ou une sensibilisation passive conférée par le lait maternel. La dernière hypothèse nous parut la plus probable vu le fait que le poulain fut injecté au moment du même sevrage.

Comme la première injection du poulain n° 3.906 fut aussi la cause d'une réaction, il nous parut prudent de remettre l'abatage de ce sujet jusqu'au temps où les larves éventuellement présentes seraient d'une taille plus aisément visible. Que ce poulain réagit à la seconde injection, cela ne présenta rien de surprenant vu la sensibilisation engendrée par l'injection antérieure.

Dans les expériences sur les poulains n°s 3.905 et 3.904, nous tachâmes d'éviter, si possible, la sensibilisation passive conférée par le lait des juments et, dans ce but, nous remîmes les injections jusqu'à 2 mois après le sevrage. Pendant ce temps, les sujets furent nourris de lait de vache modifié par addition de fourrages ordinaires.

Évidemment, nous réussîmes à éviter cette influence déconcertante, et pûmes constater qu'un extrait gastrophilique, fortement nuisible pour un cheval adulte (n° 3.814), ne provoqua aucune réaction chez des sujets non sensibilisés antérieurement par une invasion des œstres.

Les extraits des larves de *Gastrophilus* ne contiennent donc aucune substance toxique ou pathogène et n'agissent que comme tout antigène quelconque introduit dans un animal préalablement sensibilisé.

Comme nos observations et nos expériences justifient l'opinion qu'au moins un type de parasites *sensibilise* leurs hôtes, nous nous efforçâmes de déterminer si cela est de règle pour les parasites, en général, et nous profitâmes des occasions qui s'offrirent de vérifier ce fait. Nous obtînmes les résultats suivants :

a) *Ascaris megalocephala*. — Le cheval n° 3.677 qui, dans quelques expériences antérieures, s'était montré très sensible à

l'intoxication anaphylactique, reçut, le 4 avril 1917, à 10 h. 39 du matin, une injection intraveineuse d'un extrait préparé de cinq individus d'*Ascaris megalocephala.*

Dans la minute après l'injection, le sujet devint agité, commença à piaffer, montra des efforts expulsifs et évacua des matières fécales, solides et flatulentes. Il y avait à la fois une salivation et un larmoiement profus.

A 10 h. 42 : le cheval respirait avec effort et tomba à terre. Une sudation abondante se manifesta et les veines superficielles se gonflèrent fortement. Le pouls devint imperceptible.

A 10 h. 43 : l'animal entra en agonie, fit des efforts expulsifs violents, et montra des tremblements musculaires.

A 10 h. 44 : mort.

L'autopsie montra une congestion de la muqueuse de la vessie. L'écorce rénale était légèrement congestionnée. Le cœur était partout parsemé d'hémorragies sous-épicardiques et sous-endocardiques. Les poumons étaient fortement tuméfiés et étaient d'un volume à peu près cinq fois plus que le volume normal. D'ailleurs, il faut le dire, le sujet était légèrement poussif.

b) *Trichodectes parum pilosus.* — Le sujet âgé, n° 3.815, était atteint d'une phtiriase trichodectique bien marquée, et nous offrit une belle occasion de constater, par l'essai expérimental, si les ectoparasites aussi sont capables de provoquer dans leurs hôtes des réactions semblables à celles produites par les larves gastrophiliques.

De 1.200 à 1.500 poux (*Trichodectus parum pilosus*), recueillis sur le sujet, furent broyés et macérés dans de l'eau salée pendant 24 heures, à la température de la glacière. L'extrait fut passé à travers un peu d'ouate et fut injecté au sujet n° 3.815, par la voie veineuse, tandis qu'à l'instant même quelques gouttes du liquide furent instillées dans un des yeux de l'animal, afin de précipiter une réaction allergique éventuelle. Cette instillation n'amena aucun résultat.

L'injection fut finie le 12 janvier 1917, à 3 h. 1, le pouls battait 42 fois par minute, et la respiration était de 18 par minute. Deux minutes après l'injection, la fréquence respiratoire augmenta comme celle du pouls. On constata des tics musculaires, larmoiement et des efforts expulsifs.

A 3 h. 6 : profus écoulement de mucosités nasales. Défécation.

A 3 h. 10 : diaphorèse. Efforts expulsifs abdominaux. La muqueuse rectale sortit de l'anus. Les naseaux se dilatèrent.

A 3 h. 15 : la sudation devint plus générale et abondante. Le larmoiement et l'écoulement nasal continuèrent d'une façon frappante. Le pouls était rapide et presque imperceptible.

A 3 h. 20 : la fréquence respiratoire augmenta. Pouls imperceptible. Continuation du jetage nasal. Défécations fréquentes. Abaissement léger de la diaphorèse.

A 3 h. 30 : respirations, 52 par minute.

A 3 h. 35 : le sujet tomba à terre. Respirations, 60 par minute.

A 3 h. 45 : évacuations volumineuses de matières fécales, liquides et sanguinolentes. Cessation de la sudation, de l'écoulement nasal et du larmoiement.

A 4 h. 5 : le cheval se leva et évacua encore des fèces sanguines.

A 4 h. 10 : le sujet tomba une fois de plus, gémit et évacua des matières sanguines.

A 4 h. 20 : le cheval se leva encore. Expulsion violente d'une quantité copieuse de fèces liquides et sanguinolentes. Respirations, 48 par minute. Le pouls persista, imperceptible.

A 4 h. 30 : le sujet se coucha et montra un écoulement involontaire de matières fécales sanguinolentes.

Le sujet continua, faible et apathique, jusqu'à la mort qui survint l'après-midi du 13 janvier.

L'examen du cadavre mettait à jour un cœur mou et flasque, avec plusieurs pétéchies endocardiques dans le ventricule gauche. La muqueuse vésicale était hyperémique et parsemée de pétéchies. La muqueuse gastrique présentait des petites taches érodées, tandis que la couche muqueuse de l'intestin était marquée de quelques hémorragies minuscules.

Afin d'éprouver la toxicité des matières trichodectiques, quatre cobayes reçurent chacun, par injection sous-cutanée, 5 cent. cubes de l'extrait de poux. L'injection ne causa aucune réaction perceptible.

c) *Toxascaris limbata*. — Un certain nombre de ces nématodes furent pesés, broyés, macérés pendant 24 heures, dans dix

fois leur poids d'eau salée. L'extrait fut centrifugé, filtré et conservé par quelques gouttes de chloroforme.

Le 5 mai 1917, des chiens furent injectés avec cet extrait. Voici le compte rendu de ces expériences :

I. — Le sujet n° 4.046 reçut, par la voie veineuse, 1 cent. cube de l'extrait de *Toxascaris*. Environ 3 minutes plus tard le chien vomit, courut de tous côtés d'une manière errante, montra une respiration augmentée, et dans les 5 minutes déféqua. Le sujet se coucha pendant quelques minutes dans un état de complet abattement. Forcé de se lever, l'animal montra un léger degré d'incoordination des mouvements.

Les parasites trouvés à l'autopsie consistaient en un nombre d'individus de *Belascaris marginata* et un de *Dibothriocephalus latus*.

II. — Un bouledogue n° 4.047, jeune et vigoureux, reçut une injection intraveineuse de 1 cent. cube de l'extrait de *Toxascaris*. Dans les 2 minutes le sujet vomit, parut déprimé, mais se remit tout de suite, et en moins de 10 minutes avait regagné l'état normal. L'autopsie ne révéla aucun parasite.

III. — Le chien n° 4.048 fut injecté intraveineusement avec 1 cent. cube de l'extrait de *Toxascaris*. En 2 minutes le sujet marcha avec agitation, vomit, déféqua et se coucha. Après 5 minutes l'animal était parfaitement normal. On ne constata pas de parasites à l'autopsie.

IV. — Le sujet n° 4.049 reçut par injection intraveineuse 1 cent. cube de l'extrait de *Toxascaris*. Nulle réaction ne fut constatée et aucun parasite ne fut trouvé à l'autopsie.

V. — Un chien n° 4.050 fut injecté par la voie veineuse avec 1 cent. cube de l'extrait de *Toxascaris*. L'injection ne fut suivie d'aucune réaction. L'autopsie ne révéla pas de parasites.

VI. — Une injection de 2 cent. cubes de l'extrait de *Toxascaris* fut donnée au chien 4.051 par la voie veineuse. En moins de 2 minutes le chien manifesta un ténesme marqué et de la strangurie, suivis d'évacuations fécales fréquentes, presque continuelles. Bientôt les évacuations prirent un caractère semi-liquide. Plus tard l'animal commença à vomir, pendant que les défécations continuaient.

Forcé de se mouvoir, le chien marcha d'une allure chancelante. Après 10 minutes le sujet se coucha, resta épuisé, respira

lourdement et refusa de se lever. Il resta dans cette condition pendant plus d'une heure, mais après ce temps il se leva, et bien lentement revint à l'état normal.

d) *Belascaris marginata.* — Quelques vers de cette espèce furent pesés, broyés, macérés pendant 24 heures dans 10 fois leur poids d'eau salée au titre physiologique, puis centrifugés, filtrés et conservés par l'addition de quelques gouttes de chloroforme. Plusieurs chiens furent injectés avec cet extrait le 21 mai et le 12 juin 1917. Voici les résultats :

I. — Le sujet n° 3.954 reçut, par injection veineuse, 2 cent. cubes de l'extrait de *Belascaris*. Aucune réaction ne se manifesta, et l'autopsie montra l'absence de parasites.

II. — On injecta au chien n° 3.955, intraveineusement, 2 cent. cubes de l'extrait de *Belascaris* dans ce sujet. Dans les 30 secondes le chien se mit à vomir, montrant une nausée extrême, et tomba à terre. Une minute plus tard l'animal déféqua et montra une respiration dyspnéique. Le sujet resta dans cette condition pendant 3/4 d'heure, montra dans ce temps salivation, larmoiement profus, jetage muqueux et évacua des matières fécales sanguines. Quand le chien se leva, il marcha d'une allure chancelante, eut des nausées et une fois de plus évacua des fèces sanguines. La respiration continua d'une manière haletante.

Au bout de 1 heure et demie, l'animal courut çà et là d'une façon agitée et à ce moment la conjonctive était fortement congestionnée. Le sujet mourut avant le lendemain.

L'autopsie mit au jour une vive gastro-entérite avec une hémorragie dans le canal intestinal. Le cœur était flasque et mou, mais ne montra aucune tache hémorragique. Les poumons, bien contractés, n'étaient que légèrement congestionnés. Les autres organes semblaient normaux. Il n'y avait aucun parasite.

III. — L'animal n° 3.956 reçut, par injection intraveineuse, 3 cent. cubes de l'extrait de *Belascaris*. Environ 1 minute après l'injection, le chien courut de tous côtés comme s'il cherchait une place pour vomir, commença à chanceler et tomba à terre 2 minutes après l'injection. Après 6 minutes le sujet vomit et déféqua, respira rapidement et se montra épuisé. 14 minutes plus tard, le chien vomit à nouveau et évacua des fèces semi-

liquides et sanguinolentes. Quand on força le sujet à marcher, il tomba de côté comme demi-paralysé. 10 minutes plus tard, le pouls devint très faible et l'animal ne put se maintenir debout.

Quinze minutes plus tard le chien haletait et ne pouvait marcher qu'avec effort. De temps en temps il essaya de déféquer.

Le sujet mourut pendant la nuit qui suivit et l'autopsie révéla que l'estomac et les intestins étaient légèrement congestionnés et que le cœur présentait des ecchymoses et des pétéchies sous-endocardiques. Les poumons étaient contractés. Les autres organes étaient d'une apparence normale. Aucun parasite ne fut trouvé.

IV. — Le chien n° 3.957 reçut, par la voie veineuse, 2 cent. cubes de l'extrait de *Belascaris*. 1 minute et demie plus tard le sujet commença à courir d'une place à l'autre et hurla comme en détresse. Bientôt il commença à chanceler et perdit toute force de son membre droit antérieur. Le vomissement suivit, et le sujet tomba à terre avec le pouls faible et la respiration très rapide et laborieuse.

Le chien déféqua et vomit une fois de plus 10 minutes après l'injection. 10 minutes plus tard l'animal tâcha de marcher mais n'eut pas la force de se tenir debout. A ce moment il y eut une évacuation des matières fécales semi-liquides et sanguines. Après 15 autres minutes, le sujet, après des efforts expulsifs violents, rejeta du sang. 20 minutes encore après, une autre quantité de sang fut évacuée par l'anus. La respiration continua rapide. 20 minutes plus tard le sujet devint très agité. Il mourut pendant la nuit qui suivit l'expérience.

L'autopsie mit au jour une gasto-entérite assez marquée qui s'étendait d'un bout à l'autre du tube digestif. Il y avait du sang dans la cavité de l'abdomen. Le cœur montra des hémorragies sous-endocardiques bien marquées. Les poumons étaient contractés et congestionnés. Les reins présentaient plusieurs infarctus hémorragiques. La muqueuse vésicale était fortement congestionnée. Aucun parasite ne fut trouvé.

V. — L'animal n° 4.113 reçut une injection veineuse de 2 cent. cubes de l'extrait de *Belascaris*, qui ne fut suivie d'aucune réaction visible. 20 minutes plus tard, 2,25 cent. cubes

du même extrait furent donnés avec un résultat également négatif. L'autopsie montra un grand nombre de *Tænia serrata*.

VI. — Le sujet n° 4.112 reçut une injection intraveineuse de 1 cent. cube de l'extrait de *Belascaris*. Au bout de 2 minutes environ, le chien manifesta de l'inquiétude, tenta de vomir, se coucha, devint très déprimé et resta dans cet état pendant quelques minutes. Il vomit 12 minutes plus tard, mais 20 minutes après l'animal parut avoir repris l'état normal.

Après une demi-heure, le sujet fut injecté avec 2,25 cent. cubes du même extrait, mais cette fois, il n'y eut pas de résultats. Le chien resta en bonne santé.

VII. — On injecta au chien n° 4.114, par la voie veineuse, 1 cent. cube de l'extrait de *Belascaris*. Immédiatement, le sujet commença à vomir, montra une respiration rapide, bientôt se coucha et resta très tranquille ne faisant que quelques efforts expulsifs.

Après 10 minutes, le pouls devint à peu près imperceptible. Quand le sujet fut forcé de se lever, il marcha péniblement en montrant une incoordination des mouvements assez nette.

Bientôt le chien tomba à terre et resta tranquille avec un pouls imperceptible. Il mourut 35 minutes après l'injection.

On constata dans ce cas que la phase de la respiration rapide était très courte et, pendant la dernière moitié de l'expérience, la respiration devint superficielle et déprimée.

L'autopsie mit à jour une entérite nette avec près de 100 cent. cubes de sang dans le canal intestinal. Il y avait une gastrite légère. Tous les organes internes montrèrent de la stase veineuse. Les poumons n'étaient pas tuméfiés, mais présentaient une congestion veineuse.

c) *Dipylidium caninum*. — Un certain nombre de ces cestodes furent pesés, broyés, macérés pendant 24 heures dans 10 fois leur poids d'eau salée et l'extrait ainsi obtenu fut ensuite centrifugé, filtré et conservé par l'action d'un peu de chloroforme.

Le 18 mai, le 1er juin et le 14 juin 1917, quelques chiens furent injectés avec une certaine quantité de l'extrait avec les résultats suivants :

Le sujet n° 3.950 reçut par injection intraveineuse 4 cent.

cubes de l'extrait de *Dipylidium*. Aucune réaction ne suivit. Le chien n'hébergeait pas de parasites.

Le chien n° 3.951 fut injecté par la voie veineuse avec 2 cent. cubes de l'extrait de *Dipylidium*. Dans les 6 minutes on constata des tremblements, des efforts expulsifs abdominaux, suivis d'une évacuation fécale. 2 minutes plus tard la défécation fut répétée. Le pouls devint faible et l'animal montra du malaise. Au bout de 5 minutes l'animal fit encore des efforts expulsifs et évacua des gaz. 2 minutes plus tard le pouls était imperceptible, la respiration était un peu accélérée et on constata de la salivation. Le chien n'hébergeait qu'un individu de *Toxascaris limbata*.

Cet animal n° 3.952 reçut une injection intraveineuse de 2 cent. cubes de l'extrait de *Dipylidium*. Nulle réaction n'en résulta et aucun parasite ne fut trouvé à l'autopsie.

Le sujet n° 3.953 fut injecté avec 2 cent. cubes de l'extrait de *Dipylidium* par la voie veineuse. Aucune réaction ne se manifesta. L'autopsie ne révéla aucun parasite.

Le chien n° 4.046 reçut une injection veineuse de 3 cent. cubes de l'extrait de *Dipylidium*. On ne constata aucune réaction. Le sujet était l'hôte de deux individus de *Belascaris marginata* et d'un de *Dibothriocephalus latus*.

Le sujet n° 4.047 reçut par injection veineuse 3 cent. cubes de l'extrait de *Dipylidium*. Aucune réaction ne suivit. Aucun parasite ne fut trouvé à l'autopsie.

Cet animal n° 4.047 reçut par injection veineuse 3 cent. cubes de l'extrait de *Dipylidium*. Il n'y eut pas de réaction. L'autopsie montra l'absence de parasites.

Le sujet n° 4.049 reçut 3 cent. cubes de l'extrait de *Dipylidium* par injection intraveineuse. Nulle réaction ne se manifesta. Le chien n'hébergeait aucun parasite.

Le chien n° 4.050 fut injecté avec 3 cent. cubes de l'extrait de *Dipylidium* par la voie veineuse. Aucune réaction ne fut observée. Aucun parasite ne fut trouvé à l'autopsie.

Le sujet n° 4.051 reçut une injection intraveineuse de 3 cent. cubes de l'extrait de *Dipylidium*. Nulle réaction n'en résulta. L'animal hébergeait un grand nombre d'individus de *Dipylidium caninum*.

Le sujet n° 4.118 reçut dans la veine 7 cent. cubes de l'extrait

de *Dipylidium*. Aucune réaction ne suivit. L'autopsie révéla plusieurs individus de *Tænia serrata*.

Le chien n° 4.119 reçut par la voie veineuse une injection de 15 cent. cubes de l'extrait de *Dipylidium*. Il n'y eut pas de réaction. L'autopsie mit à jour un individu de *Toxascaris limbata*.

f) *Tænia serrata*. — Un nombre considérable de ces vers furent pesés, broyés et macérés pendant 24 heures dans 10 fois leur poids d'eau salée, puis l'extrait fut centrifugé, filtré et conservé par l'addition d'une petite quantité de chloroforme.

Le 21 juin 1917, on expérimenta comme suit :

Le sujet n° 4.126 reçut, par injection intraveineuse, 5 cent. cubes de l'extrait de *Tænia*. Moins de 2 minutes après, le chien devint timide, se cacha dans un coin et commença à baver et à respirer rapidement.

L'animal resta parfaitement tranquille pendant 10 minutes. La salivation continua, mais la respiration s'améliora. Au bout de 10 minutes de plus, le chien se leva et parut tout à fait normal. L'autopsie révéla un individu de *Toxascaris limbata*.

En même temps que le chien n° 4.126, on injecta par la voie veineuse trois lapins respectivement avec 1, 2 et 3 cent. cubes du même extrait. Dans la minute tous les lapins se mirent à éternuer, ce qui continua pendant 1 minute à peu près.

Les respirations augmentèrent d'une façon assez nette et bientôt les lapins se couchèrent dans un état semi-paralysé et restèrent dans cette position pendant environ 10 minutes. Forcés de se mouvoir, les animaux ne pouvaient plus sautiller de la façon des lapins, mais marchaient d'une allure vacillante.

En apparence ils reprenaient l'état normal : cependant un d'eux mourut pendant la nuit suivante. L'autopsie révéla dans l'un des lapins 3 petits kystes dans la région sous-lombaire de la cavité abdominale. Les kystes furent soumis à M. le Dr B. Ranson de Washington qui y reconnut des *Cysticercus pisiformis*. Les deux autres lapins ne montrèrent rien d'important à l'autopsie.

Deux cobayes injectés par la voie intrapéritonéale avec 3 cent. cubes du même extrait ne montrèrent aucune réaction.

g) *Gyropus ovalis* et *Gyropus porcelli*. — Le 14 juin 1917,

8 cobayes, dont un certain nombre hébergeaient les poux nommés, furent injectés avec un extrait préparé de ces parasites.

Nul résultat ne suivit, mais il faut dire que l'extrait, préparé d'une manière peu soigneuse, était peut-être trop faible.

Bien que, dans la série d'expériences dont nous venons de rendre compte, nous n'ayions pas eu l'occasion d'expérimenter sur des animaux témoins sûrement non sensibilisés, comme dans les expériences avec les extraits gastrophiliques, nous ne pouvons pas échapper à la conclusion que les réactions constatées étaient d'une nature anaphylactique.

Dans les expériences sur des chevaux, les manifestations produites par les extraits de *Trichodectes* et d'*Ascaris* montrèrent des rapports frappants avec celles qui suivirent les injections de *Gastrophilus* et de blanc d'œuf, tandis que les symptômes observés dans nos sujets canins ressemblèrent si nettement à ceux décrits par Biedl et Kraus [15] que toute autre conclusion ne nous paraît guère possible.

Nous croyons que nous sommes confirmés dans cette opinion par le fait qu'un nombre des sujets se montrèrent réfractaires à toute action nuisible des matières injectées, qui, par conséquent, semblèrent non toxiques *per se*.

La répartition universelle de quelques-uns des parasites nous permettait peut-être d'attendre un plus grand nombre de réactions, surtout dans le cas de *Dipylidium caninum*, qui est fortement répandu dans nos environs.

Au contraire, il faut reconnaître la possibilité d'une variabilité considérable dans le mode et le degré de sensibilisation causée par les parasites, tandis que nos méthodes pharmaceutiques employées dans la préparation des extraits n'étaient certainement pas irréprochables.

Quant à l'expérience avec l'extrait de *Tænia serrata* sur le chien et le lapin, les résultats nous semblèrent très significatifs, quoique les réactions obtenues ne fussent pas incontestablement d'une nature anaphylactique. A cet égard il nous faudra des expériences supplémentaires.

Regardant les résultats de cette série d'expériences à la lumière de celles faites antérieurement avec les extraits de *Gastrophilus*, nous n'avons plus de doute sur la nature des

réactions observées, aussi bien que sur celle des intoxications parasitaires aiguës constatées par Stazzi, Piana et Belfanti [16] et par d'autres auteurs.

VI

ALLERGIE AUX EXTRAITS PARASITAIRES

Dans une lettre reçue, il y a plusieurs mois, de notre estimé collègue M. Seymour Hadwen, il eut la bonté de nous faire connaître sa découverte intéressante que certains hôtes de parasites peuvent réagir localement d'une façon allergique si des substances appartenant aux mêmes parasites étaient mises en contact avec certaines muqueuses. Subséquemment M. Hadwen décrivit ses découvertes plus en détail dans un article très remarquable [17].

Afin de constater si les matières gastrophiliques avaient des qualités irritantes ou étaient capables de provoquer des réactions allergiques sur des animaux présumés sensibilisés aussi bien que sur d'autres non sensibilisés, nous expérimentâmes en pratiquant l'instillation dans l'œil et l'injection intradermique de l'extrait.

L'extrait fut préparé de façon que 10 larves de *Gastrophilus equi* et le même nombre de *Gastrophilus nasalis* furent broyées et traitées par 40 cent. cubes d'eau salée. Les deux lots furent mélangés, filtrés à travers de l'ouate et chauffés à 60° C. pendant 1 heure.

Le 2 novembre, à 3 h. 45 de l'après-midi, quelques gouttes de l'extrait furent instillées dans un des yeux de chaque animal au moyen d'un petit blaireau. Voici les détails de l'expérience :

Cheval n° 2981 (*fièvre des marais*). — Cinq minutes après l'instillation, il y eut un larmoiement qui devint plus profus au bout de 10 minutes. La conjonctive était nettement enflée. Le lendemain, le larmoiement avait cessé, le gonflement était réduit et, dans le coin de l'œil, il y avait un petit amas muco-purulent épais.

Cheval n° 3625. — En trois minutes, il y eut un larmoiement intense et 2 minutes plus tard la conjonctive se gonflait. A 5 heures, le gonflement était très marqué, mais le larmoiement diminua.

Le lendemain, le gonflement était moins net et une accumulation muco-purulente se trouvait dans l'angle de l'œil.

Cheval n° 3677. — Il y eut un larmoiement profus dans les 4 minutes après l'instillation de l'extrait. En 15 minutes les larmes coulaient sur le chanfrein en quatre courants distincts. Les paupières étaient nettement gonflées. A 5 heures, l'œil était presque fermé, mais l'écoulement des larmes diminuait. Le sujet semblait déprimé et triste.

Le lendemain, il y avait encore un peu de gonflement, le larmoiement avait cessé et un grumeau muco-purulent occupait le coin de l'œil.

Cheval n° 3722. — On constata un léger larmoiement en 10 minutes à peu près. Après 15 minutes, la sécrétion lacrymale augmenta et devint profuse en 30 minutes. Les paupières n'étaient que légèrement gonflées.

A 5 heures, il y avait encore du larmoiement, mais le gonflement restait léger.

Le lendemain, il y avait encore une petite enflure des paupières et un peu d'exsudat palpébral.

Cheval n° 3723. — Le larmoiement commença à se montrer lentement au bout de 20 minutes à peu près et augmenta pendant 30 minutes. A 5 heures, les larmes coulaient d'une façon assez nette, mais aucune enflure ne se déclarait.

Le lendemain quelque larmoiement persistait, mais autrement l'œil était normal.

Cheval n° 636. — Sujet artificiellement infecté de l'anémie infectieuse en 1908 et continuellement tenu enfermé dans l'écurie depuis ce temps. — Aucune réaction ne fut provoquée.

Cheval n° 3742.— Ce sujet montra dans les 15 minutes un léger larmoiement qui continua d'une façon modérée pendant 5 heures. Le lendemain il restait encore une petite quantité d'exsudat muco-purulent dans le coin de l'œil, qui du reste était parfaitement normal.

Cheval *Babe*. — Le sujet ne fut observé qu'au bout de 5 heures ; il manifestait alors un larmoiement modéré dont toute trace avait disparu le lendemain.

Cheval *Daisy*. — Ce cheval ne fut observé qu'au bout de 5 heures ; il montrait alors les résultats d'une réaction vive avec un larmoiement profus et un gonflement assez net des paupières. Le sujet était déprimé et triste. Le lendemain les paupières étaient encore légèrement gonflées et le coin de l'œil était occupé par un grumeau muco-purulent.

Le 3 novembre 1916, nous nous servîmes du même extrait pour une épreuve ophtalmique sur une série d'animaux appartenant à des espèces différentes.

Nous constatâmes les résultats suivants :

ANIMAUX	RÉSULTATS
Huit bovidés	Négatifs.
Quatre chèvres	Négatifs.
Un mouton	Négatifs.
Douze lapins	Négatifs.
Douze cobayes	Négatifs.
Trois chiens	Negatifs.
Un chat	Négatifs.

Les épreuves intracutanées furent faites avec un extrait

gastrophilique préparé à la façon usuelle et chauffé à 60° C. pendant deux heures. Une quantité d'un centimètre cube à peu près fut injectée dans la peau de l'encolure.

Nous constatâmes :

Cheval n° 3747. — Le 9 novembre 1916, injection à 2 h. 50 de l'après-midi.

A 3 heures, gonflement léger.

A 3 h. 5, enflure de 2 centimètres de diamètre.

A 3 h. 15, enflure de 3 centimètres de diamètre.

A 3 h. 30, enflure du même diamètre.

A 4 h. 1, l'œdème commençait à descendre au-dessous de la piqûre.

A 5 h. 30, la condition précitée persistait.

Le 10 novembre, à 8 heures du matin, le gonflement œdémateux était descendu de près de 5 centimètres au-dessous de la piqûre d'injection et devenait plus épais dans les parties les plus éloignées de la piqûre où la peau avait une épaisseur d'un centimètre à peu près.

A 5 heures du soir, la réaction s'améliorait.

Le 11 novembre, à 8 heures du matin, l'enflure avait disparu.

Cheval n° 2981. — Le 10 novembre, injection à 3 h. 22 de l'après-midi.

A 3 h. 30, la peau autour de la piqûre était légèrement épaissie.

A 4 heures, l'enflure avait un diamètre de 2 cent. 5 et une épaisseur de 5 centimètres.

A 4 h. 30, le diamètre mesurait 3 centimètres et l'épaisseur 1 centimètre.

A 6 heures, le diamètre avait augmenté jusqu'à 3 cent. 5.

Le 11 novembre 1916, à 8 heures du matin, le diamètre de l'enflure était 5 centimètres et son épaisseur 3 cent. 5. L'épaississement de la peau se montrait très douloureux.

Le 12 novembre 1916, à 9 heures du matin, la réaction diminuait.

Le 13 novembre 1916, à 9 heures du matin, l'épaississement avait à peu près disparu.

Cheval n° 3677. — Le 10 novembre, injection à 3 h. 20 de l'après-midi.

A 3 h. 35, le sujet manifestait de l'inquiétude, des respirations augmentées et piaffait à cause de la colique.

A 3 h. 40, évacuation des matières fécales semi-liquides. Une diaphorèse abondante se déclara. Le sujet était très agité.

A 3 h. 45, la sudation était profuse. Il y avait larmoiement assez net, qui semblait plus profus de l'œil qui avait servi antérieurement dans l'épreuve oculaire. La fréquence respiratoire était 54 par minute. Le cheval toussait et se frottait furieusement contre les deux côtés de sa stalle.

A 3 h. 50, le sujet piaffait violemment. En 5 minutes, il y avait deux évacuations fécales assez molles. La robe était mouillée et chaude de la sueur. Le cheval toussait fortement et manifestait une expectoration vive. Température, 37°7 C.

A 4 heures, il y avait deux évacuations fécales flatulentes. Le pouls était très faible.

A 4 h. 10, les coliques persistaient, mais la diaphorése, l'expectoration et le larmoiement s'abaissaient. Les respirations, 50 par minute, étaient exagérées et violentes. Les évacuations liquides continuaient.

A 4 h. 35, la respiration exagérée persistait, mais autrement l'intensité de la réaction diminuait. Deux évacuations liquides. Température, 37°6 C.

A 4 h. 45, le sujet se coucha, mais se leva en 5 minutes. La respiration violente continua.

A 5 heures, température 37°4 C. La peau était sèche et la réaction avait cessé à l'exception de la respiration forte et rapide.

A 6 heures, la respiration forte continua.

Le 11 novembre, à 8 heures du matin, le sujet apparemment avait regagné son état normal. Aucune réaction autour de la piqûre intracutanée ne fut constatée.

Le 21 novembre 1916 : dix bovidés furent injectés par la voie intracutanée dans l'un des plis à la base de la queue avec un extrait gastrophilique semblable à celui dont on s'était servi chez les chevaux.

Deux des sujets montrèrent un épaississement assez net pendant que chez les autres il n'apparut que des enflures petites et passagères.

Nous eûmes aussi l'occasion d'expérimenter avec l'extrait d'autres parasites. Dans ce but, un certain nombre d'individu d'*Ascaris mégalocephala* furent pesés, broyés et macérés pendant 24 heures dans 10 fois leur poids d'eau salée; l'extrait fut ensuite centrifugé, filtré et chauffé à 60° C. pendant une heure. L'extrait fut instillé sur la conjonctive en faisant usage d'un petit blaireau.

Voici ce qui suivit :

Cheval n° 636 (6 *avril* 1917). — Dans les deux minutes, il y avait un larmoiement profus et en 5 minutes l'enflure ferma à peu près l'œil. Le sujet devint agité, piaffa, secoua la tête et montra une respiration accélérée.

Cinq heures plus tard les parties étaient encore gonflées, mais le lendemain l'œil avait un aspect normal.

Cheval n° 3798 (6 *avril* 1917). — L'instillation fut suivie d'une réaction modérée. Il y avait larmoiement accompagné d'un moyen degré de bouffissure. Aucune manifestation générale ne fut constatée. Le gonflement persista pendant quelques heures, mais le lendemain il avait entièrement disparu.

Cheval n° 3813 (6 *avril* 1917). — Il y avait un léger degré de gonflement et de larmoiement, mais aucune réaction constitutionnelle ne fut constatée. Toute réaction avait cessé 5 heures plus tard.

Cheval n° 3814 (6 *avril* 1917). — L'application de l'extrait causa une réaction locale très nette avec larmoiement et gonflement qui atteignit son plus grand développement en vingt minutes et qui persista jusqu'au lendemain.

Cheval n° 3822 (6 *avril* 1917). — Une réaction palpébrale suivit bientôt l'instillation et dura jusqu'au lendemain.

Comme expérience de contrôle, le même extrait fut instillé dans l'un des yeux de 4 chèvres, 4 chiens, 1 chat, 6 lapins

et 6 cobayes. Les résultats furent absolument négatifs chez tous ces animaux.

Nous expérimentâmes aussi avec un extrait d'*Ascaris* préparé de la même façon, à l'exception qu'au lieu de l'eau salée nous fîmes usage d'une solution de glycérine à 50 p. 100. Nous constatâmes ce qui suit :

Cheval n° 636 (14 *juin* 1917). — Dans la minute et demie après l'instillation, il y avait un larmoiement qui devint très profus après 10 minutes.





Fig. 1.

En même temps les tissus palpébraux se gonflèrent. Une heure et demie après l'instillation le larmoiement avait cessé et le gonflement commençait à s'apaiser. Sept heures plus tard la réaction avait disparu.

Cheval n° 4116 (14 *juin* 1917). — Pas la moindre réaction après l'instillation.

Cheval n° 3822 (14 *juin* 1917). — Le larmoiement commença dans la demi-minute et bientôt devint profus. En même temps, il y avait une bouffissure palpébrale et après 10 minutes celle-ci était bien marquée (fig. 1). L'écoulement des larmes continua vivement et ruissela sur la face. Le sujet essaya de se frotter l'œil de temps en temps. La conjonctive devint congestionnée. Après 20 minutes l'écoulement acquit un caractère muqueux.

Après une heure et demie le larmoiement avait cessé et l'enflure était un peu réduite, mais persistait encore considérablement 7 heures plus tard.

Poulain n° 3966 (14 *juin* 1917). — Le larmoiement se déclara après une minute environ et la conjonctive devint injectée. Après 5 minutes les paupières se gonflèrent légèrement et l'écoulement des larmes augmenta sans devenir profus,

Le même jour on se servit d'un certain nombre de chevaux

de ferme pour les expériences, mais les circonstances nous empêchèrent de faire des observations détaillées. Voici ce que nous constatâmes :

ANIMAL	RÉSULTATS
Babe	Nulle réaction.
Lee.	Nulle réaction.
King	Réaction légère, qui avait disparu en six heures.
Topsy	Réaction légère, encore visible après six heures.
Zelma	Réaction légère, qui avait disparu en six heures.
Polly	Réaction moyenne, encore visible après six heures.
Roy	Réaction légère, mais assez persistante.
Dick	Réaction moyenne, encore visible après six heures.
Dan	Réaction légère, persistante six heures plus tard.
Gipsy	Réaction légère, qui avait disparu après six heures.
Frank	Nulle réaction.
Robert	Nulle réaction.
Gim	Nulle réaction.
Riley.	Réaction légère, qui avait disparu six heures plus tard.
Mack.	Réaction légère, encore visible après six heures.
Taft	Réaction légère, mais persistante.
Johnson . . .	Nulle réaction.
Stella	Réaction légère, disparu après six heures.
Loretta. . . .	Réaction douteuse.
Sylvio	Nulle réaction.
Dot	Nulle réaction.
Cora	Réaction légère, qui, après six heures, n'était plus visible.
Nellie	Nulle réaction.
Lady	Nulle réaction.
Bertha	Nulle réaction.
Ruby.	Nulle réaction.

Comme contrôle on instilla l'extrait glycériné d'Ascaris dans l'un des yeux de 4 cobayes, 2 lapins et 4 chiens. Ces animaux ne montrèrent pas trace de réaction.

Quelques expériences furent faites avec un extrait des larves de *Hypoderma lineata*, préparé à la manière usuelle et chauffé pendant 1 heure à 60° C.

Le 16 avril 1917, 3 bœufs, les hôtes des larves précipitées, reçurent dans l'un des yeux une instillation de l'extrait de *Hypoderma*. Un d'eux réagit et montra un léger larmoiement et une enflure palpébrale moyenne. Dans les deux autres sujets les réactions étaient encore moins vives et, dans tous les trois, il n'y avait plus rien de visible le lendemain.

Six autres bœufs et trois veaux, qui n'hébergeaient aucune

larve, reçurent aussi un peu de l'extrait dans l'un des yeux, mais nulle réaction ne fut constatée.

Un extrait de *Dipylidium caninum* fut instillé dans l'un des yeux de 4 chiens, mais les résultats furent parfaitement négatifs.

Tandis que dans quelques-unes de nos expériences nous n'obtînmes pas les réactions frappantes décrites par Hadwen et Bruce [17], dans beaucoup d'autres nos résultats confirmèrent leur découverte concernant la sensibilisation allergique des hôtes de certaines espèces de parasites vis-à-vis des substances dérivées de ceux-ci.

Résumant les résultats obtenus dans les expériences dont nous venons de rendre compte, les conclusions principales, qui suivent, nous semblent justifiées :

1. Il n'y a pas de raison de croire que les espèces de *Gastrophilus* jouent un rôle spécifique dans l'étiologie de l'anémie infectieuse ou de la « fièvre des marais » du cheval.

2. Les intoxications graves, qui suivent les injections des matières gastrophiliques, ne sont pas causées par une substance spécifique, au sens de l' « Œstrine » des Seyderhelm.

3. De telles intoxications ne sont que des manifestations de l'anaphylaxie et elles sont parfaitement analogues à celles que provoquèrent des protéines quelconques.

4. Plusieurs espèces parasitaires sensibilisent leurs hôtes qui, après une injection ou instillation déchaînante, répondent par des réactions anaphylactiques ou allergiques.

5. Les qualités toxiques, se manifestant d'une manière aiguë, des extraits de certains parasites sont dues à une sensibilisation spécifique et antérieure des animaux.

6. Il est raisonnable de se figurer que les substances qui provoquent le choc anaphylactique peuvent être introduites dans la circulation par les mêmes voies qui servirent préalablement aux matières sensibilisatrices.

7. Par la présence plus ou moins constante de certains parasites dans quelque partie du corps, il est bien possible que celui-ci soit constamment chargé d'anaphylatoxines d'origine parasitaire.

8. Il est également possible qu'une telle intoxication puisse mener à des altérations morbides, plus ou moins définies et caractéristiques.

Si l'idée d'une telle anaphylaxie parasitaire peut être acceptée, plusieurs problèmes s'imposent à l'attention de l'investigateur. Quelles sont, par exemple, les conséquences d'un empoisonnement anaphylactique aussi prolongé? A-t-il un rapport avec certaines maladies chroniques comme les anémies, les scléroses, les dégénérescences parenchymateuses et les états morbides, si facilement attribués à l'auto-intoxication? Et encore, quelles sont les modifications du sang de quelques-uns de nos chevaux anaphylactiques, sang qui produisit des réactions fébriles chez d'autres sujets? Ce sont là des questions, il nous semble, qui méritent des efforts expérimentaux consciencieux.

La découverte de Hadwen offre aussi des possibilités d'une haute valeur pratique. Ne peut-elle pas être employée comme un moyen révélateur dans la diagnose de certaines maladies parasitaires? Après ce que nous avons constaté, n'est-il pas raisonnable de concevoir une épreuve susceptible de déceler, dans un troupeau atteint de cénurose, les agneaux qui hébergent les vésicules fatales en provoquant une réaction oculaire par l'instillation d'un extrait du *Tænia cœnurus* ou du contenu de son kyste? Les réactions allergiques ou anaphylactiques ne peuvent-elles pas servir dans les recherches sur les rapports biologiques des parasites et de leurs hôtes?

Nous ne le savons point : il faut suivre la piste indiquée. Avant tout, il faudra des méthodes plus raffinées que les nôtres dans la préparation des réactifs. Une concentration plus forte nous semble nécessaire dans le cas de quelques espèces parasitaires.

Enfin se présente le problème intéressant des réactions éventuelles *in vitro*. Nous avons déjà abordé cette question, mais nos expériences jusqu'à présent sont restées infructueuses. Cependant nous ne doutons guère que la sensibilisation anaphylactique d'origine parasitaire, démontrable *in vivo*, ne puisse aussi se manifester dans l'éprouvette par des réactions assez nettes.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Vallée et Carré. — *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, t. CXXXIX, p. 331.

[2] Vallée et Carré. — *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, t. CXXXIX, p. 1239.

[3] Carré et Vallée. — *Bulletin mensuel de l Office de renseignements agricoles*, p. 1075 (1905).

[4] R. Seyderhelm. — *Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie*, Bd 58, p. 285.

[5] K. R. Seyderhelm et R. Seyderhelm. — *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, Bd 79, p. 149.

[6] K. R. Seyderhelm et R. Seyderhelm. — *Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde*, Bd 14, p. 50.

[7] Besredka. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, t. LXVII. p. 226 (1909).

[8] Carré et Vallée. — *Recueil de Médecine vétérinaire*, t. LXXXXII, p. 193 (1916).

[9] Carré et Vallée. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXX, p. 383 (1916).

[10] Favero. — *Il nuovo Ercolani*, anno XXI, p. 4 et 17 (1916).

[11] Ciuca. — *Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie*, Bd IX, p. 308.

[12] Briot et Dopter. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, t. LXIX, p. 10.

[13] Briot et Dujardin-Beaumetz. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, t. LXIX, p. 14.

[14] Guyot. — *Archives de Parasitologie*, t. IV, p. 169 (1901).

[15] Biedl et Kraus. — *Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung*, de Kraus et Levaditi, erste Ergänzungsband, p. 255 (1903).

[16] Stazzi, Piana et Belfanti. — *Revue générale de Médecine vétérinaire*, t. VI, 2e sem., p. 405 (1905).

[17] Hadwen et Bruce. — *Journal of the American veterinary Medical Association*, vol. 51, p. 15 (1917).

[18] Weinberg et Julien. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, t. LXX, p. 337 (1911).

[19] Henry et Ciuca. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, t. LXXII, p. 983 (1912).

[20] Weinberg et Ciuca. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, t. LXXIV et LXXV (1913).

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

32e ANNÉE AOUT 1918 N° 8

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de E. Metchnikoff.

RECHERCHES SUR LA GENÈSE DES CORPUSCULES DU *MOLLUSCUM CONTAGIOSUM*

par le prof. Dr FRANCESCO SANFELICE,

Directeur de l'Institut d'Hygiène de l'Université royale de Modena.

(Avec la planche V.)

Le *Molluscum contagiosum* est une maladie cutanée qui se manifeste sous forme de nodules de différentes dimensions, parfois peu nombreux, parfois étendus sur toute la surface du corps, comme cela a été décrit par Kaposi, Lindström et par d'autres auteurs. Kaposi nous a donné ensuite la description des nodules géants de *Molluscum*.

Bien avant qu'on eût connu le résultat des expériences, on a constaté la nature contagieuse de la maladie : on a vu qu'un enfant, atteint de nodules de *Molluscum*, avait transmis en peu de temps la même symptomatologie à d'autres enfants de la même école.

La reproduction expérimentale de la maladie a réussi pour la première fois à Retzius en 1871. En 1888, Haab s'est transmis avec succès à lui-même la maladie par inoculation.

On peut observer les nodules du *Molluscum contagiosum* aux

points les plus divers, au coude, sur le dessus du pied, sur le cuir chevelu. La peau du visage, du cou, des organes génitaux sont les sièges préférés de la maladie. Il est difficile de déterminer la période d'incubation dans les cas de maladie déclarée spontanément. Vidal a noté, dans ses recherches expérimentales, une période d'incubation de trois à six mois, Haab celle de six mois, tandis que Pick a constaté une incubation de dix semaines et Nobl de sept semaines.

Le *Molluscum contagiosum* des amphibies, l'épithélioma contagieux des pigeons, ainsi que le *Molluscum contagiosum* de l'homme, représentent une affection limitée à la couche de Malpighi. Neisser, contrairement à l'opinion de Kaposi, croyait que le *Molluscum* était consécutif à une prolifération des glandes sébacées, et que les corpuscules caractéristiques du *Molluscum* constituaient un produit de transformation du protoplasma non caractéristique de l'affection. Dans le derme, le virus du *Molluscum contagiosum* ne donne origine à aucune altération, parce que la couche des cellules basilaires constitue une barrière protégeant l'organisme contre le virus.

Le virus du *Molluscum* contagieux est uniquement épidermique; en pénétrant dans la peau il y produit une prolifération du réseau de Malpighi. Par contre, le virus de l'épithélioma contagieux des pigeons est de ceux auxquels on a donné le nom de « dermotrope », parce qu'ils se fixent même par les voies de la circulation sanguine.

Les cellules du réseau malpighien ne meurent pas; elles conservent même, jusqu'à un certain point, leur intégrité, bien que le virus y ait pénétré.

Dans les nodules, au début de leur développement, que l'on peut voir à l'aide du microscope seul, on n'observe, d'après Neisser, aucune participation des follicules, mais seulement des altérations épithéliales. Le nodule, qui représente la lésion, est constitué par des lobules, ou zones épithéliales, en prolifération, qui s'étendent dans le tissu connectif, d'abord dans le sens latéral, ensuite en profondeur. En général, les cellules basilaires et celles qui leur succèdent immédiatement dans une ou deux couches ne présentent pas d'altérations. Dans les cellules de Malpighi, qui suivent immédiatement, on constate une granulation trouble du protoplasma, particulièrement au

voisinage du noyau. Les corps protoplasmiques de ces cellules sont grossis, le noyau, habituellement aplati, est poussé vers la périphérie de la cellule.

La substance qui se développe dans le protoplasma et donne origine aux corpuscules typiques du *Molluscum* se présente, dans la description de Neisser, comme une masse de fines granulations, composée de corpuscules clairs et minces.

Les corpuscules du *Molluscum* contagieux qui, à l'état frais, sont réfringents et habituellement homogènes, donnent, d'après Blaschko, la réaction de la substance hyaline; ils se gonflent dans une solution de potasse à 30 p. 100; ils se colorent en jaune-brun par la teinture d'iode; ils ne subissent aucune altération par l'addition d'acide sulfurique; traités par l'acide nitrique ils prennent une couleur jaune-vert; avec de l'acide osmique ils donnent la réaction des graisses. Il s'agit donc des mêmes réactions qu'on peut constater dans les corpuscules de l'épithélioma contagieux des pigeons et dans ceux du *Molluscum* contagieux des amphibies.

Un fait important pour l'étiologie du *Molluscum contagiosum* de l'homme, qui souligne encore davantage les liens existant entre cette affection d'une part et l'épithélioma contagieux des pigeons et le *Molluscum contagiosum* des amphibies d'autre part, a été mis en relief en 1905 par Juliusberg; nous voulons parler du passage du virus du *Molluscum* à travers le filtre en porcelaine. L'inoculation à l'homme du liquide filtré donne naissance au *Molluscum*, après une période d'incubation de 50 jours. Il résulte des expériences de Juliusberg que sur trois personnes une seule fut atteinte de la maladie. Ce fait indiquerait que la diminution considérable de la quantité du virus, constatée dans les produits de filtration de l'épithélioma contagieux des oiseaux, existe aussi dans les produits de filtration du *Molluscum contagiosum* de l'homme, diminution due au filtre de porcelaine qui en retient une grande partie.

Les investigations les plus récentes sur l'étiologie du *Molluscum contagiosum* sont celles de Lipschütz, qui, par analogie avec ce qui a été constaté pour l'épithélioma contagieux des oiseaux, croit que l'agent pathogène est représenté par des corpuscules très petits, ronds, peu réfringents, que l'on peut

voir à l'ultramicroscope. Ces corpuscules sont immobiles; ils n'ont pas de cils et ne présentent pas de membranes. Sur les préparations en séries, fixées à l'alcool absolu, à l'alcool-éther, à l'acide osmique, puis colorées par la méthode de Löffler (coloration des cils) ou par la méthode de Giemsa, ou bien par la fuchsine phénique, on reconnaît facilement les corpuscules. La multiplication du virus se fait par division et par étranglement; on peut voir, en effet, à côté de diploformes, d'autres formes dans lesquelles les deux corpuscules sont encore unis par une bandelette très mince et peu colorée.

Les essais de cultiver le virus n'ont donné jusqu'à présent aucun résultat positif.

Sur les coupes des nodules de *Molluscum*, traitées par la méthode de Giemsa, le protoplasma des cellules malpighiennes malades est rempli de corpuscules élémentaires. De couleur rouge foncé, ils sont situés dans une substance fondamentale peu colorée, sous forme d'amas compacts, séparés les uns des autres par des espaces clairs. Par la méthode de la coloration de Pappenheim, les altérations du cytoplasma peuvent être démontrées dans les cellules malpighiennes profondes. A côté du noyau on voit une masse bleue qui remplit toute la cellule dans les couches superposées. Dans les coupes colorées par la méthode de Giemsa on voit, au lieu d'une masse homogène bleue, un grand nombre de corpuscules élémentaires. De cette façon, les deux méthodes de coloration se complètent.

Un intéressant détail histologique, qu'on peut démontrer généralement, soit par la méthode de Pappenheim, soit par celle de Giemsa, dans les cellules malpighiennes atteintes de l'infection, consiste dans la présence des corps de dimensions variables et de forme irrégulière, ronds ou allongés, dispersés dans le cytoplasma. Lipschütz ne saurait affirmer si, dans ce cas, il s'agit d'une substance nucléaire ayant fait irruption dans le cytoplasma. Nous savons que Kuznitzky et Mac Callum ont parlé de profondes altérations nucléaires dans le *Molluscum contagiosum*. Le premier de ces auteurs prétend que c'est le noyau qui présente les premières altérations. Cependant, d'après Lipschütz, ces formations pourraient même prendre origine de substances plastiniques qui se trouvent normalement dans le cytoplasma.

Les corpuscules du *Molluscum contagiosum* seraient donc, ainsi que ceux de l'épithélioma contagienx des oiseaux, de Negri et de Guarnieri, des produits caractéristiques de réaction dus à un virus spécifique. D'après Lipschütz, les agents du *Molluscum contagiosum*, représentés par les corpuscules très minces, appartiennent au groupe des strongyloplasmes.

Il résulte des recherches que j'ai publiées dernièrement sur le *Molluscum contagiosum* des amphibies que les corpuscules décrits par Mingazzini comme parasites sont des formations d'origine nucléaire. L'altération limitée au réseau de Malpighi a commencé par un grossissement des noyaux et du plasma cellulaire. En même temps que cette altération on observe que les masses nucléolaires, qui prennent une couleur rouge lorsqu'on les traite par la méthode de Mann, grossissent considérablement. Quand ces corps nucléolaires ont atteint une dimension considérable, la membrane nucléaire se rompt et met en liberté les corpuscules caractéristiques du *Molluscum*. De plus, ces recherches ont montré que les corpuscules caractéristiques du *Molluscum*, qui prennent naissance dans le noyau, présentent dans l'intérieur, quand ils ont atteint une certaine dimension, une structure pareille aux corpuscules, qui ont été décrits par Negri dans le système nerveux des animaux morts de rage et aux corpuscules décrits par Lentz et Sinigaglia dans le système nerveux des chiens atteints de gourme.

Il est sans doute intéressant de savoir que dans le *Molluscum contagiosum* des amphibies, il s'agit d'un virus filtrable.

Les recherches, qui ont été publiées plus tard sur l'épithélioma contagieux des pigeons, ont montré que les corpuscules ou les inclusions cellulaires, caractéristiques de cette affection, limitée au réseau de Malpighi, ainsi que le *Molluscum contagiosum* des amphibies et le *Molluscum contagiosum* de l'homme, sont d'origine nucléaire. L'altération commence par un grossissement des noyaux et des plasmas cellulaires. Cette première période de la maladie est suivie de l'expulsion des noyaux de masses nucléolaires colorées en rouge par l'éosine (méthode de Mann). Ces masses arrivées ainsi dans le plasma cellulaire deviennent, en augmentant de volume, des corpus-

cules typiques ou inclusions cellulaires. On a constaté ensuite que l'application de la méthode d'extraction des nucléoprotéides sur la peau malade permet de transmettre avec eux constamment la maladie aux animaux sains. Le traitement de la peau malade par une solution de potasse à 1 p. 100, pendant 10, 20, 24, 34 et 44 heures et plus, est incompatible avec la vie des parasites présumés de la maladie; on sait que même les spores du charbon, qui sont considérées comme les germes les plus résistants aux agents chimiques, ne résistent pas plus de 10 heures à cette solution de potasse. Il faut prendre en considération aussi que le virus de l'épithélioma contagieux se comporte comme un acide. En effet, si longtemps que la peau malade se trouve en contact avec la solution de potasse sous forme d'une masse pultacée très fine, le virus n'est pas à même d'exercer son action; les expériences d'inoculation dans la peau des pigeons sains donnent constamment lieu à un résultat négatif. Cependant, quand on filtre sur un morceau de toile la masse pultacée, maintenue en contact avec la solution de potasse pendant quelques heures, et quand on ajoute ensuite au produit filtré une solution d'acide acétique à 1 p. 100 jusqu'à la production d'une réaction acide, le précipité qui se produit ainsi et qui est un nucléoprotéide donne, une fois lavé avec de l'eau distillée et inoculé dans la peau de pigeons sains, constamment la maladie cutanée. Le traitement par l'acide acétique a mis en liberté le virus, qui était comme un acide combiné avec la base.

S'il s'agissait d'agents parasitaires, si les corpuscules très minces décrits par Lipschütz et d'autres auteurs étaient vraiment les facteurs de la maladie, on ne saurait pas s'expliquer l'absence d'une action pathogène en présence de la solution de potasse à 1 p. 100 et de la rentrée de l'action pathogène après un traitement par une solution d'acide acétique à 1 p. 100. Il s'agit par conséquent d'une maladie des cellules de Malpighi qui donne origine à une substance toxique, qu'on peut extraire en se servant de la méthode d'extraction des nucléoprotéides. Cette substance, après avoir été inoculée dans la peau des pigeons normaux, donne lieu à la même altération avec production de la même substance toxique de la part des cellules. Sur la nature, l'origine de cette maladie des cellules malpi-

ghiennes, nous ne possédons jusqu'à présent aucune donnée scientifique. Il existe peut-être un rapport entre elle et l'échange des matières modifié ou avec quelque substance produite dans un premier temps par un parasite. Il faut certainement d'autres recherches pour pouvoir affirmer ce côté de la question.

Quant au *Molluscum* contagieux de l'homme, je n'ai pas réussi à avoir à ma disposition un de ces cas avec nodules diffus sur toute la surface du corps. Je n'avais donc pas un matériel suffisant pour l'extraction des nucléoprotéides. J'ai pu faire de la sorte seulement des recherches histologiques en appliquant aux coupes la méthode de Mann, dans le but d'établir l'origine des corpuscules caractéristiques.

La fixation des nodules a été obtenue par le bichlorure de mercure acétique, le liquide de Zenker ou de Flemming, en remplaçant l'acide osmique par la formaline selon la formule suivante : Acide chromique à 1 p. 100 : 160 parties; formaline commerciale : 80 parties; acide acétique : 10 parties. Après avoir laissé les pièces dans la solution fixatrice pendant 24 heures, elles ont été lavées à l'eau distillée pendant 48 heures.

Les meilleurs résultats ont été obtenus par cette dernière méthode de fixation. Les cellules malpighiennes dans lesquelles la lésion commence (Pl. V, fig. 3, 4, 5, etc.) se distinguent des cellules normales (fig. 1, 2) par un grossissement considérable des noyaux et des plasmas cellulaires. Ainsi, nous constatons que, par analogie avec ce que nous avons vu dans le *Molluscum contagiosum* des amphibies et dans l'épithélioma contagieux des pigeons, le commencement de la maladie est caractérisé, dans le *Molluscum* contagieux de l'homme, par le grossissement des cellules de Malpighi.

Au fur et à mesure que le noyau et le cytoplasma de la cellule augmentent de dimensions, on observe que le nucléole prend la couleur rouge et devient plus grand que le nucléole ou les nucléoles des cellules normales. Près du nucléole coloré en rouge on voit parfois deux petits corpuscules colorés en bleu (fig. 3). Les masses nucléolaires colorées en rouge peuvent être uniques ou doubles à l'intérieur des noyaux (fig. 4, 5, 7, 10, 12). Dans un deuxième temps, la masse nucléolaire colorée en rouge par l'éosine est chassée du noyau. On observe souvent

des cellules dans lesquelles la masse nucléolaire est à moitié contenue dans le noyau et à moitié dans le cytoplasma (fig. 6). Quand la masse nucléolaire est entourée dans le plasma cellulaire, elle peut être ou ne pas être entourée d'une aréole claire (fig. 7, 8). En dehors de la masse nucléolaire expulsée, on peut rencontrer souvent dans le plasma cellulaire de petits granules teints en rouge, disséminés autour du noyau. Il s'agit de granules observés pour la première fois par Benda et appelés par Apolant granules de Benda (fig. 4, 5). La masse nucléolaire qu'on trouve dans le cytoplasma conserve parfois une couleur rouge; d'autres fois elle se teint en bleu (fig. 11, 12). Cette différence de coloration de la masse nucléolaire, qu'on peut constater dans le cytoplasma, devient constante quand la masse nucléolaire augmente de volume (fig. 13, 14, 15). La masse nucléolaire grossie est entourée tout d'abord d'une aréole claire (fig. 13, 14), elle se fusionne ensuite peu à peu avec le cytoplasma (fig. 15, 16), de façon qu'on ne réussit plus à distinguer nettement les contours (fig. 16). Enfin, quand elle est devenue plus grande, elle reprend des contours nets et se distingue du protoplasma cellulaire restant (fig. 17). Quand la masse nucléolaire n'est pas fortement grossie, elle a ordinairement une apparence homogène; au contraire, quand elle occupe une grande partie du cytoplasma, elle se présente sous un aspect granuleux et permet quelquefois de distinguer des vacuoles (fig. 17). En grossissant davantage, l'inclusion prend la forme typique d'un corpuscule de *Molluscum* (fig. 18), et alors la masse du corpuscule a un aspect finement granuleux sur fond légèrement rougeâtre. Dans plusieurs corpuscules mûrs est prédominante la couleur rouge, au lieu qu'on ne constate aucune coloration bleue.

Si l'expulsion des masses nucléolaires est récente, les noyaux ne présentent pas d'autres masses nucléolaires teintes en rouge (fig. 6, 8, 9); au contraire, quand l'expulsion des masses nucléolaires est un fait accompli depuis quelque temps, on observe dans le noyau une nouvelle formation de masses nucléolaires capables de prendre la couleur rouge par la méthode de Mann. On peut donc conclure que les corpuscules du *Molluscum contagiosum* de l'homme présentent la même genèse que les corpuscules ou les inclusions de l'épithélioma

contagieux des pigeons et les corpuscules du *Molluscum contagiosum* des amphibies, avec la seule différence que dans le *Molluscum contagiosum* de l'homme et dans l'épithélioma contagieux des pigeons la formation des corpuscules se fait par expulsion des noyaux et sans destruction de ces derniers, tandis que dans le *Molluscum contagiosum* des amphibies après la transformation des masses nucléolaires en corpuscules caractéristiques, ceux-ci sont mis en liberté par la destruction de la membrane nucléaire et non par expulsion. On a donc ainsi dans le *Molluscum contagiosum* des amphibies la destruction des noyaux, tandis que ces noyaux restent intègres dans le *Molluscum* contagieux de l'homme et dans l'épithélioma contagieux des pigeons.

Enfin, on peut constater qu'aux analogies de la genèse des corpuscules des trois affections, correspond la filtrabilité des virus dans les trois manifestations pathologiques.

LITTÉRATURE

JULIUSBERG. — Zur Kenntnis des Virus des *Molluscum contagiosum* des Menschen. *Deutsche med. Wochsch.*, 1905.

KAPOSI. — *Molluscum contagiosum giganteum. Arch. f. Dermat.*, 1897.

KUZNITZKY. — Beitrag zur Kontroverse über die Natur der Zellveränderungen bei *Molluscum contagiosum. Arch. f. Dermat.*, 1895.

LIPSCHUTZ. — *Molluscum contagiosum. Wien. klin. Wochsch.*, 1910.

— Untersuchungen über *Molluscum contagiosum. Dermatol. Zeitschrift*, 1907.

— Zur Kenntnis des *Molluscum contagiosum. Wien. klin. Wochsch.*, 1907.

— Weitere Beiträge zur Kenntnis des *Molluscum contagiosum. Archiv f. Dermatol.*, 1911.

SANFELICE. — *Epithelioma contagiosum* der Tauben. *Zeitsch. f. Hygiene*, Bd 66, 1913.

— Ueber einige nach der Mannschen Methode färbbare und Parasiten vortäuschende Gebilde kernigen Ursprungs bei einer Hautkrankheit des *Discoglossus pictus. Centralbl. f. Bakteriol.*, Bd 70, 1913.

LÉGENDE DE LA PLANCHE V

Toutes les figures représentent les coupes de nodules du *Molluscum contagiosum* de l'homme faites à l'aide de l'Oc. 3. Ob. 1/2 Zeiss. La coloration des coupes a été faite suivant la méthode de Mann.

Fig. 1. — Cellule normale du réseau de Malpighi au voisinage d'un nodule de *Molluscum contagiosum*.

Fig. 2. — *Idem*.

Fig. 3. — Nodule de *Molluscum contagiosum*. La cellule fait voir un grossissement considérable du noyau et du protoplasma cellulaire. Dans l'intérieur du noyau on observe une masse nucléolaire plus grande, colorée en rouge par l'éosine, et 2 masses nucléolaires bien plus petites, colorées en bleu.

Fig. 4. — Nodule de *Molluscum contagiosum*. La cellule est considérablement grossie. Dans le noyau on observe 1 masse nucléolaire colorée en rouge par l'éosine. Dans le protoplasma cellulaire on distingue plusieurs granules colorés en rouge par l'éosine.

Fig. 5. — Cellule d'un nodule de *Molluscum contagiosum* qui présente dans le noyau 2 masses nucléolaires colorées en rouge par l'éosine et dans le protoplasma cellulaire 1 masse nucléolaire complètement expulsée et accompagnée de 2 granules très minces colorés également en rouge par l'éosine.

Fig. 6. — Cellule d'un nodule de *Molluscum contagiosum* montrant l'expulsion d'une masse nucléolaire.

Fig. 7. — Cellule d'un nodule de *Molluscum contagiosum* montrant 2 masses nucléolaires contenues dans le noyau et 1 masse nucléolaire expulsée dans le plasma cellulaire, entourée d'une aréole claire.

Fig. 8. — Cellule d'un nodule de *Molluscum contagiosum* ne montrant aucune masse nucléolaire dans le noyau. 1 masse nucléolaire a été déjà expulsée et se trouve dans le plasma cellulaire.

Fig. 9. — Cellule d'un nodule de *Molluscum contagiosum* dans laquelle la masse nucléolaire a été déjà expulsée et se trouve légèrement grossie dans le plasma cellulaire.

Fig. 10. — Cellule d'un nodule de *Molluscum contagiosum* dans laquelle on observe 2 masses nucléolaires dans le noyau et une autre un peu plus grande déjà expulsée et entourée d'une masse bleuâtre.

Fig. 11. — Cellule d'un nodule de *Molluscum contagiosum* dans laquelle on voit 1 masse nucléolaire rouge plus grande et 2 masses nucléolaires plus petites bleues. Dans le corps cellulaire on observe 1 masse nucléolaire bleue entourée d'une aréole claire.

Fig. 12. — Cellule d'un nodule de *Molluscum contagiosum* montrant 2 masses nucléolaires contenues dans le noyau en couleur rouge, et 1 masse nucléolaire d'une couleur bleue dans le plasma cellulaire.

FIG. 13. — Cellule d'un nodule de *Molluscum contagiosum* qui présente 1 masse nucléolaire rouge plus grande et 1 masse nucléolaire bleue plus petite dans le noyau. Dans le plasma cellulaire se trouve 1 masse nucléolaire légèrement grossie entourée d'une aréole claire.

FIG. 14. — Cellule d'un nodule de *Molluscum contagiosum* montrant dans le plasma cellulaire 1 masse nucléolaire bleue, plus grande que celle que l'on voit dans la figure précédente, entourée elle aussi d'une aréole claire.

FIG. 15. — La masse nucléolaire existant dans le plasma cellulaire est un peu plus grande que celle qu'on peut voir sur la figure précédente, et ne présente pas de contours nets.

FIG. 16. — Dans le plasma cellulaire on observe 1 masse bleue plus grande que celle que nous présente la figure précédente avec des contours peu nets.

FIG. 17. — La masse existant dans le plasma cellulaire est devenue plus grande; elle est vacuolisée en quelques points et s'approche de la forme définitive du corpuscule du *Molluscum contagiosum.*

FIG. 18. — Cellule d'un nodule de *Molluscum contagiosum* avec un corpuscule de *Molluscum* complètement évolué.

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de E. Metchnikoff.

SUR LES CORPS EN MASSUES DANS DES CAVERNES TUBERCULEUSES

par VILHELM JENSEN,
Docteur en médecine,
Chef du laboratoire bactériologique de l'Institut de pathologie générale de l'Université de Copenhague.

(Avec les planches VI-VIII.)

Metchnikoff, en 1888, découvrit, dans de vieilles cultures de bacilles tuberculeux, des formes en massue singulières; plus tard, des formes pareilles ont été observées par Babes, Dixon, Craig et d'autres. Une forme spéciale en massue dont le rapport avec les bacilles tuberculeux était douteux fut décrite, en 1895, par Coppen-Jones.

Comme ces éléments offrent, à mon avis, beaucoup d'intérêt et d'importance pour bien comprendre la place que les bacilles tuberculeux occupent d'un côté, parmi les bactéries ordinaires, et de l'autre, parmi les streptothricacées, je me permets de présenter ici le résultat de quelques examens microscopiques portant sur les massues décrites par Coppen-Jones. Ils contribueront, peut-être, à faire mieux comprendre leur genèse et à prévenir des erreurs dues à la grande ressemblance de ces massues avec celles qu'on voit souvent dans les cas d'actinomycose.

Je fus incité à publier ces recherches par le passage suivant de Cornet et Kossel dans le *Traité des micro-organismes pathogènes*, de Kolle et Wassermann, à la page 406 : « Die Beobachtung von Coppen-Jones darf daher nicht als Beweis für das Vorkommen actynomycesähnlicher kolbiger Wuchsformen der Tuberkelbacillus im Sputum betrachtet werden. »

Coppen-Jones les décrit comme des massues tout à fait pareilles à celles propres à l'actinomycose et il les regarde

comme « des dépôts colloïdes sur des filaments élastiques et d'autres restes organiques en masses tuberculeuses croissantes ».

Elles entourent les filaments élastiques qui restent lisses. Leur base est creuse, en forme d'entonnoir; elles sont souvent stratifiées et peuvent présenter des ramifications; bref, la structure des massues est, pour l'actinomycose et la tuberculose, jusqu'au moindre détail, tout à fait la même. Seulement, dans le dernier cas, il n'y a naturellement pas de filaments.

Non colorées, les massues se montrent, selon Coppen-Jones, fortement réfringentes, un peu jaunâtres et, le plus souvent, légèrement arrondies aux bouts; la stratification est peu distincte, mais, quand elle apparaît, les couches intérieures sont d'une réfraction plus faible que les couches extérieures.

Il les a trouvées, dans 30-50 p. 100 des cas, dans des crachats renfermant des filaments élastiques: « Dans les tissus nécrotisés des cavernes, selon mes expériences, elles ne font jamais défaut ». Il dessine l'image d'une série de massues des cavernes d'un homme de soixante ans; sur la paroi de celles-ci se trouvaient des incrustations blanches crayonneuses sous la forme de parties anguleuses jusqu'à 5 millimètres de diamètre, pareilles à des morceaux éclatés d'une muraille blanchie. Ces fragments se composaient surtout de bacilles tuberculeux et, d'ailleurs, de filaments élastiques avec des massues.

A en juger par le résumé en question, les produits n'ont été examinés qu'à l'état incolore; aucune mention n'est faite des massues colorées. C'est surtout ce point qui offre peut-être quelque intérêt.

J'ai pu dans 10 cas étudier de pareilles croûtes des parois de cavernes et, comme Coppen-Jones, toujours j'ai pu y trouver des massues.

Par contre, malgré bien des recherches, je n'ai jamais réussi à en trouver dans d'autres tissus tuberculeux, pas plus que dans des parois de cavernes où l'examen macroscopique ne révélait pas de croûtes. Comme elles sont peu solides, il n'est pas surprenant que l'on en trouve souvent dans les crachats où, comme on sait, il y a parfois de gros conglomérats de bacilles tuberculeux.

Dans mes expériences, les croûtes, qui étaient peu solides et assez fragiles, étaient détachées avec précaution, de manière à les conserver aussi cohérentes que possible. Je les fixais en alcool. Au début, je les faisais inclure en celloïdine ; mais, comme ceci empêchait l'emploi de différentes méthodes de coloration, j'ai essayé de les faire inclure dans de la paraffine. Les coupes étaient collées sur des lames enduites d'une couche mince d'eau albumineuse. Les plus petits fragments étaient de la sorte bien fixés et pouvaient résister à toutes les manipulations ultérieures.

Voici la méthode la plus simple pour colorier les massues ; elle permet de constater, d'une façon évidente, s'il y a des massues ou non :

Coloration pendant 5 minutes par la fuchsine acide à 2 p. 100, lavage à l'eau, décoloration par solution concentrée aqueuse d'acide picrique, qu'on change 2 ou 3 fois ; puis déshydratation avec de l'alcool absolu, clarification avec du xylol et inclusion dans du baume.

Sur les préparations (Voy. les figures des planches VII et VIII), on voit des conglomérats plus ou moins grands, plus ou moins réguliers, tout pareils à ceux qu'on voit dans différentes formes d'actinomycose, surtout dans celle de la langue de bœuf.

Cette ressemblance était surtout frappante, quand les coupes avaient été faites de façon à montrer les massues arrangées en rosettes (Pl. VII, fig. 7 et 8). Dans d'autres endroits, elles étaient groupées en deux rangs avec un point au milieu faiblement teint. Souvent les dimensions des massues n'étaient pas les mêmes aux deux extrémités (Pl. VII et VIII, fig. 13 et 21).

Une autre méthode de coloration, donnant des images fort belles et instructives, est la coloration prolongée au bleu de méthyl-éosine, indiquée par Mann. Ici les massues sont d'un rouge éclatant, tandis que le reste se teint d'une nuance bleuâtre.

Pour se faire une idée plus nette du rapport entre les massues et les filaments élastiques, on peut teindre les coupes avec de la solution résorcine-fuchsine de Weigert (fuchseline), puis, de la fuchsine acide et d'acide picrique. comme plus haut.

On peut s'assurer sur ces coupes que les massues sont grou-

pées en tubes ou en rosettes autour des filaments élastiques. La coloration de ceux-ci était, sur les parties entourées des massues, moins forte et moins distincte que sur les parties libres, et, dans beaucoup d'endroits, on pouvait suivre les filaments des parties fortement teintes aux parties moins fortement colorées entre les massues (Pl. VII, fig. 11).

Parfois on voyait dans des endroits où les filaments élastiques étaient plus denses que les massues se trouvaient au niveau des extrémités effilées des filaments libres.

On voit nettement les relations entre les filaments élastiques, sur les microphotographies (fig. 1-4 de la planche VI). La première montre la répartition des groupes de massues sur coupe, un peu grossis; la figure 2 présente un réseau des filaments élastiques, avec des massues groupées à leurs extrémités libres; sur les figures 3 et 4, des filaments élastiques plus longs, entourés de tubes formés de massues. Dans un seul point, à peu près au milieu de la figure 4, on voit un filament central libre comme le trait d'union entre deux parties des groupes de massues.

Sur les coupes colorées à l'hématoxyline-éosine on voit également les massues et les filaments élastiques, moins nettement pourtant qu'avec des procédés de coloration indiqués plus haut. Les massues paraissent rougeâtres et les filaments élastiques bleuâtres. Lors de la coloration à l'hématoxyline par le procédé de Van Gieson, les massues sont brunes-jaunes, mais peu nettes.

Si l'on colore par le triacide d'Ehrlich ou par le mélange de Biondi-Haidenhain, les massues prennent une teinte rouge-cuivre.

La coloration par le Ziehl-Neelsen *ne les rend pas rouges*. Elles ne sont donc pas acidorésistantes comme les bacilles tuberculeux et prennent la couleur complémentaire (bleu de méthylène ou vert malachite). Elles se distinguent par là, par exemple, des massues décrites par Metchnikoff et ressemblent plutôt à celles trouvées par Babès et par d'autres.

Afin d'être renseigné sur la constitution chimique des massues et sur leurs rapports avec le tissu élastique, je me suis servi des méthodes de coloration proposées par Unna pour l'élacine et le tissu élastique.

Avec ces procédés, le bleu de méthylène-fuchsine acide donnait aux massues la couleur violacée; la safranine bleu d'eau les rendait rouges, la fuchsine acide-orange les rendait orangées, et l'orcéine-bleu de méthylène-orange les rendait bleues. Toutes ces réactions indiquent, selon Unna, qu'il s'agit d'élacine.

Je ne crois pourtant pas qu'on puisse tirer des conclusions sûres de ces réactions. Je me suis procuré des préparations de peau où, selon Unna, il devait y avoir de l'élacine; j'y ai démontré, par les colorations mentionnées, des parties de tissus qui, par leur forme, leur disposition et la ressemblance de leur coloration, devaient renfermer de l'élacine; mais cette élacine ne se colorait pas, comme les massues, par la fuchsine acide-acide picrique, ni par le procédé de Mann.

Il est donc peu probable que les massues se composent de cette matière et qu'elles soient des produits de transformation ou de rebut de tissu élastique. Elles ne se colorent pas non plus par la fuchseline de Weigert.

Il s'agit plutôt de précipitation de matières autres que les filaments élastiques; on le voit, par exemple, dans les endroits où les massues sont censées être au début de leur développement. Elles se présentent sous forme de petits corps ronds, épars, en forme de boutons autour des filaments (Pl. VIII, fig. 14 et 15). Si ceux-ci sont isolés, ils se présentent en même temps dans toute la longueur des filaments; si, au contraire, ils sont placés, par exemple, au bord d'un tube vasculaire obstrué et nécrotisé, on voit distinctement comment les massues se forment d'abord sur le côté extérieur libre des filaments extrêmes (Pl. VIII, fig. 16).

Si l'on considère les massues comme des précipités se formant autour de la pointe du filament élastique, on comprend pourquoi, comme nous l'avons déjà mentionné, les massues diminuent en volume le long du filament particulier en question (Pl. VI et VII, fig. 6 et 21).

En faveur de précipités parle également la stratification que l'on peut souvent observer, et qui a été décrite déjà par Coppen-Jones. On voit surtout la stratification sur la coupe transversale de massues particulières; on y voit également qu'à l'intérieur il semble y avoir un espace creux.

Or, s'il s'agit des précipités et non pas de produits provenant des filaments élastiques, quelle en est donc l'origine?

Il est probable que ces précipités proviennent de bacilles tuberculeux, notamment de leurs substances ciro-adipeuses.

En faveur de cette hypothèse parle d'abord le fait que les croûtes lenticulaires riches en massues se composent essentiellement de bacilles tuberculeux, et le plus souvent en telle quantité que les coupes colorées par le Ziehl-Neelsen apparaissent rouges déjà à l'œil nu; grâce à un fort grossissement, on se rend compte aisément que l'on est en présence d'une culture pure de bacilles tuberculeux sur le côté intérieur de la caverne.

C'est dans ces groupes de bacilles tuberculeux que l'on trouve des massues. Si l'on regarde de plus près, on voit que celles-ci sont plus grandes et en plus grand nombre sur le côté de préparation qui correspond à la lumière de la caverne.

A ce niveau, la coloration des bacilles tuberculeux est souvent moins forte; parfois on voit des masses qui, d'après leur apparence, ne peuvent être que des bacilles tuberculeux, quoique ne présentant pas la couleur caractéristique. Il paraît que ce sont des bacilles tuberculeux en destruction. Par contre, les bacilles sont bien développés et fortement colorés au niveau de la paroi de la caverne; la différence s'explique naturellement par ce fait que les matières dont les bacilles tuberculeux tirent leur nourriture proviennent des tissus sous-jacents.

On voit surtout le rapport entre les bactéries et les massues sur les préparations où les bacilles tuberculeux sont colorés en violet de gentiane phéniqué au lieu de Ziehl, mais d'ailleurs de la même manière, et où les massues ont été teintes plus tard de fuchsine acide-acide picrique.

En faveur de la provenance des massues des produits de destruction des bacilles tuberculeux parlent non seulement leur développement spécial dans les endroits où les bacilles sont en destruction, mais encore ce fait qu'elles ne paraissent pas sur les coupes des parois de cavernes où il n'y a pas de croûtes lenticulaires et les bactéries innombrables qui s'y trouvent.

Dans un cas spécial, j'ai eu la chance de pouvoir examiner des coupes d'une paroi de caverne avec des croûtes *in situ*; le résultat correspondait parfaitement à ce que je viens d'énoncer :

là où il y avait des masses rougeâtres de bacilles tuberculeux visibles à l'œil nu, on voyait des massues groupées comme il vient d'être indiqué; là où les bacilles tuberculeux étaient peu nombreux ou faisaient défaut tout à fait, il n'y eut point de massues.

Enfin, je trouve que les expériences d'Engel prouvent bien que les massues proviennent de matières adipeuses des bacilles tuberculeux. Cet auteur a étudié dans les crachats, au microscope, la manière dont les massues se comportent vis-à-vis de réactifs chimiques.

D'après ces expériences, les massues restent indifférentes à l'action d'eau, de carbonate de soude, d'ammoniaque, de benzine, de térébenthine, de glycérine, d'iode et d'acide sulfurique iodé. Au contraire, elles sont solubles dans l'éther bouillant et dans du chloroforme.

Les massues se décomposent partiellement dans 1 p. 100 de potasse à la chaux et d'hydrate de soude carbonatée et se dissolvent dans les solutions concentrées de ces produits. Elles se noircissent faiblement par l'acide osmique et ne se colorent pas par le sudan.

Engel croit pouvoir en conclure qu'il faut exclure de leur constitution la mucine, l'amyloïde, le glycogène, la lécithine et la cholestérine. Tout porte à croire qu'elles renferment des matières adipeuses solides, probablement de la graisse neutre. Mais, à mon étonnement, il ne croit pas qu'elles puissent provenir de bacilles tuberculeux.

Je ne crois pourtant pas, ainsi que je l'ai déjà dit, que cette opinion soit juste. Les données histologiques s'y opposent. D'ailleurs, il faut se rappeler que d'après bien des expériences — celles de Bulloch et Macleod, par exemple — les bacilles tuberculeux sont très graisseux. Presque 30 p. 100 de leur poids sec sont constitués par des substances adipeuses, le plus souvent des substances adipeuses neutres cérifères dont, en tout cas, quelques-unes sont acidorésistantes. La plupart d'entre eux ne sont pas acidorésistants, et il est très probable que ce soient ceux-ci qui, par la dégénérescence des bacilles tuberculeux, sont mis en liberté, se dissolvent peut-être en partie et se précipitent de nouveau, ou plutôt se cristallisent en massues autour des filaments élastiques, de même que des cristaux se

précipitent autour de corps étrangers, par exemple filaments (sucre candi). Si c'est justement dans les cavernes qu'ils se cristallisent autour des filaments élastiques, c'est que ceux-ci résistent le plus longtemps à la nécrose causée par les bacilles tuberculeux.

LÉGENDES DES PLANCHES

PLANCHE VI

Fig. 1. Coupe d'une croûte de caverne, filaments élastiques avec garniture de massues. Grossissement faible.

Fig. 2. Coupe d'une croûte de caverne; formation de massues sur les bouts libres de filaments élastiques. Grossissement moyen.

Fig. 3. La même coupe de croûte de caverne; grossissement plus fort.

Fig. 4. La même coupe de croûte de caverne; grossissement encore plus fort.

Fig. 5. Formations de massues pareilles à l'actinomycose.

Fig. 6. Les mêmes; sur l'une d'entre elles, pyriforme, on voit la grandeur décroissante des massues, à partir du bout en montant le filament.

PLANCHE VII

Fig. 7. Conglomérat piriforme de massues; on voit à droite le filament élastique. 1200/1, fuchseline Weigert — fuchsine acide — acide picrique.

Fig. 8. Massues autour d'un filament élastique.

Fig. 9. Rosette de massues au bout d'un filament.

Fig. 10. Conglomérats divers de massues autour de filaments élastiques; particulièrement bien développées en bas vers le côté libre.

Fig. 11. Conglomérat tubiforme autour d'un filament qu'on entrevoit à peine; orcéine — fuchsine acide — acide picrique.

Fig. 12 et 13. Conglomérats pareils à l'actinomycose. 950/1, Biondi-Haidenhain.

PLANCHE VIII

Fig. 14 et 15. Précipitation commençante autour de filaments élastiques, 1200/1 Unna I : bleu de méthylène, fuchsine acide.

Fig. 16. Stratification commençante autour d'un filament élastique, surtout sur le côté intérieur.

Fig. 17. Formation de massues déjà visible; 1200/1 Unna II : safranine-bleu d'eau.

Fig. 18, 19 et 20. Formation de massues plus avancée. Unna I.

Fig. 21 et 22. Formation de massues autour de filaments élastiques, toutes développpées; hématoxyline-éosine.

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de E. Metchnikoff.

SUR LE PALUDISME DES OISEAUX
DU AU *PLASMODIUM RELICTUM* (*vel PROTEOSOMA*)

par EDMOND SERGENT et ÉTIENNE SERGENT

(Institut Pasteur d'Algérie.)

— Étude de 560 cas expérimentaux. Immunité relative. Divers modes d'infection de l'Oiseau.
— Infection des Moustiques. Différents genres et espèces de Moustiques susceptibles d'être infectés.
— Trypanosomes du Canari et du Moineau, rencontrés au cours de ces recherches.

Nous poursuivons, depuis 12 ans (1), à Alger, l'étude du paludisme des Oiseaux à *Plasmodium relictum*, si instructif par ses analogies avec le paludisme humain, comme la découverte de Ronald Ross l'a brillamment démontré.

Nous rapprochons ci-dessous des faits déjà publiés (2) des séries d'observations et expériences nouvelles.

A. — INFECTION DES CANARIS

I. — Incubation et période d'état. — Tous les Canaris (au nombre de 560), mis en expérience à Alger depuis 12 ans (1), ont contracté l'infection à *Plasmodium*, à la suite de piqûres de *Culex* infectés ou d'une inoculation intrapéritonéale de sang d'un oiseau infecté.

L'infection est sensiblement la même lorsqu'elle est obtenue

(1) Cette étude a été écrite en mars 1914.
(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, avril 1907 [1].
Comptes rendus de l'Acad. des Sciences, 24 août 1908 [2].
Comptes rendus de l'Acad. des Sciences, 1er août 1910 [3].
Comptes rendus de la Soc. de Biologie, 6 juillet 1912 [4].

par piqûre d'Insecte ou par inoculation de sang dans le péritoine.

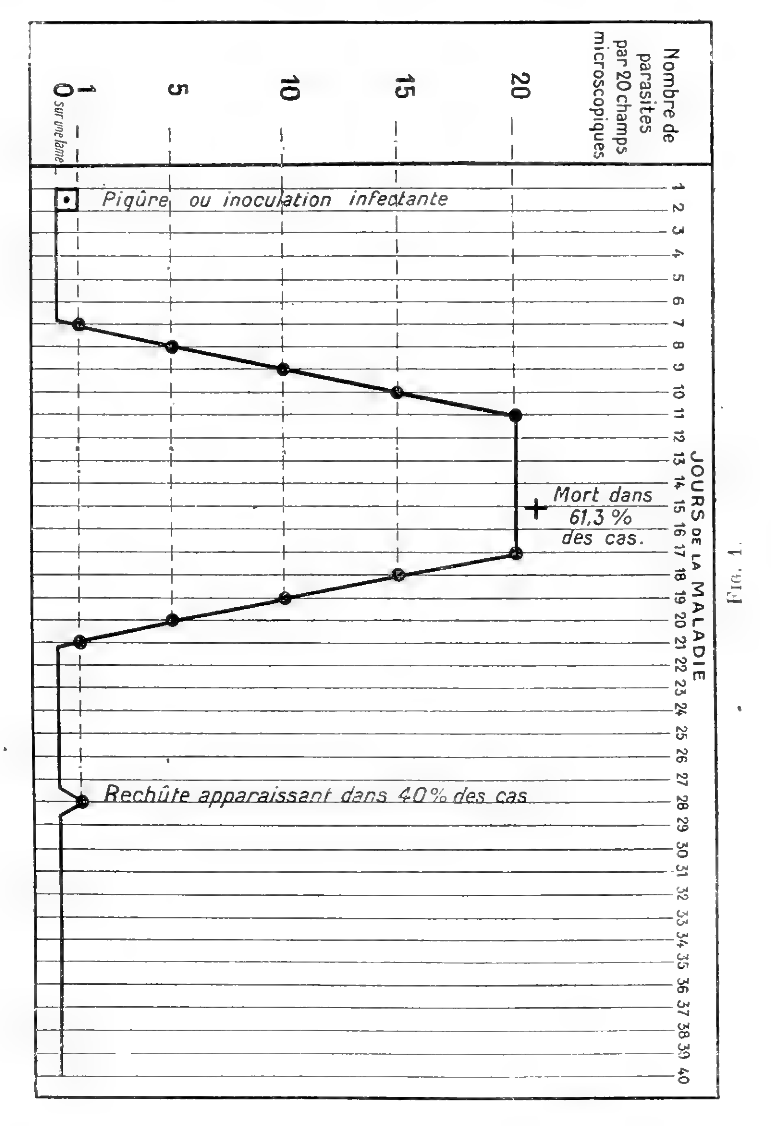


FIG. 1.

La période d'incubation varie de 3 à 10 jours. Dans un seul cas, sur plusieurs centaines, cette période a duré plus d'un mois, l'infection consécutive a été normale (fig. 1).

La période d'infection aiguë continue, pendant laquelle on constate quotidiennement la présence de parasites dans le sang, dure en moyenne 9 jours sans rémittences (minimum : 3, maximum : 29). Tous les Oiseaux ont, durant cette période aiguë, présenté au moins un parasite par champ du microscope (objectif 1/15) pendant une moyenne de 6 jours consécutifs (minimum : 1 jour, maximum : 27). Chez quelques-uns, 80 hématies sur 100 sont parasitées, et quelques hématies renferment jusqu'à 4 parasites à la fois.

La mortalité est de 61,3 p. 100 pendant cette période aiguë.

A l'autopsie, la rate est énorme, de couleur noire. Les dimensions de la rate qui sont, chez le Canari normal, de 3 à 4 millimètres $\times$ 2 millimètres en moyenne, atteignent un maximum de 15 millimètres $\times$ 5 millimètres chez les morts d'accès pernicieux.

Après cette période aiguë, les parasites disparaissent en quelques jours (de 3 à 6 jours) du sang périphérique.

La période consécutive est marquée par une absence complète de parasites dans le sang périphérique dans certains cas; dans d'autres cas, quelques parasites rares apparaissent à intervalles irréguliers.

II. — Immunité relative des anciens infectés. — Durant cette période, qui peut durer plus de 15 mois, l'inoculation d'un virus sûrement infectant (d'après les témoins) ne fait pas apparaître de parasites dans le sang périphérique. Quelquefois seulement survient une rechute brève et bénigne, avec une période d'incubation très courte (1, 2 ou 3 jours). C'est « l'acclimatement » des vieux colons en pays fiévreux. Cette immunité est acquise dès le 6e jour après le début de l'infection sanguine. Les Oiseaux restent infectants (pour les Canaris qui reçoivent leur sang, et pour les *Culex* qui les piquent) durant cette période. Celle-ci peut être beaucoup plus brève : au bout de 4 mois, les Canaris peuvent ne plus être infectants, et paraissent complètement guéris; sacrifiés, ils montrent une rate sans pigment et dont les dimensions sont redevenues normales. Dans d'autres cas, ces Canaris « anciens infectés » peuvent mourir plus facilement que les Canaris neufs, à l'occasion d'accidents intercurrents, tels qu'un refroidissement ou un coup de chaleur. Ils

sont alors trouvés porteurs d'une grosse rate noire. Il s'agit donc d'une *immunité relative*.

Nous avions déjà montré que l'on peut donner d'emblée cette immunité relative à des Oiseaux, par inoculation de sporozoïtes vieillis *in vitro* [3].

III. — Modes d'infection de l'Oiseau : 1° *Par inoculation intrapéritonéale*. — L'inoculation intrapéritonéale de quelques gouttes de sang d'Oiseau infecté confère sûrement l'infection au Canari, elle est bien supérieure à l'inoculation sous-cutanée ou intramusculaire. Notre virus, provenant d'un Moineau de la Mitidja, était conservé primitivement par passage Canari-Moustique, mais cette méthode est remplacée depuis 4 ans par l'inoculation intrapéritonéale, plus sûre et bien plus commode.

La durée d'incubation est en moyenne de 7 à 8 jours, les premiers *Plasmodium* peuvent apparaître au bout de 3 jours. La durée la plus longue observée a été de 10 jours.

2° *Par frottis de* Culex *sur la peau du Canari*. — Nous avons déjà montré [4] que des Canaris sur la peau desquels on écrase et on frotte des Moustiques infectés prennent le paludisme des Oiseaux dans la proportion de 4 sur 10.

3° *Par injection intrarectale*. — Après injection intrarectale de sang infecté, 1 Canari sur 6 contracte l'infection à *Plasmodium*. Les 5 autres restés indemnes n'acquièrent aucune immunité.

B. — INFECTION DES MOUSTIQUES

I. — Genres et espèces de Moustiques susceptibles d'être infectés par *Pl. relictum*. — Nous avions montré [1] que l'évolution sexuée de *Plasmodium relictum* peut se poursuivre et se terminer dans l'organisme de *Stegomyia fasciata*, fait confirmé par les recherches ultérieures de R. O. Neumann.

Nous apportons les faits nouveaux suivants :

L'évolution complète de *Pl. relictum* peut se dérouler également chez :

Culex sergenti Theobald,

Theobaldia spathipalpis Rondani,

Acartomyia mariæ Sergent et Theobald, Moustiques dont les

larves ne vivent que dans l'eau salée (de 30 à 60 grammes de sel marin par litre), dans des excavations sur les falaises de la côte méditerranéenne.

L'infection transmise au Canari par piqûre de l'*Acartomyia* est forte mais retardée. La période d'incubation est de 11 jours au lieu de 3 à 10 jours.

II. — Plasmodium dans la trompe du moustique. — A l'encontre de ce qu'on a constaté dans la filariose, dans le sang à *Plasmodium* qu'aspire la trompe d'un Moustique, on trouve sensiblement le même nombre de parasites que dans le sang périphérique circulant.

III. — A basse température, durée de l'évolution, jusqu'a la maturation, des zygotes dans l'estomac. — A la température de 11°5-24°, les zygotes mettent plus de 2 mois à mûrir ; l'émission des sporozoïtes n'a lieu qu'entre la 8e et la 9e semaine.

IV. — Durée de l'infection des glandes salivaires. — Nous avons vu qu'en été (18°-30°) des *Culex pipiens* ayant infecté un Canari peuvent, sans se recharger, infecter un deuxième Canari dans l'espace d'un mois, mais non pas un troisième (5 séries d'essais [1].

Des *Culex pipiens* infectés peuvent conserver leurs sporozoïtes vivants pendant 5 mois, à la température de 8°-25° ; au bout de ce temps la taille des sporozoïtes contenus dans leurs glandes salivaires peut devenir moindre que celle des sporozoïtes jeunes, normaux (de 8 à 10 μ au lieu de 11 à 14 μ). Un Canari, piqué par 2 Moustiques de ce même lot (6 examinés avaient tous montré des sporozoïtes) ne présente pas d'infection consécutive. Pourtant l'examen des glandes salivaires d'un Culex du même lot montre, 9 jours après, de nombreux sporozoïtes d'aspect normal.

V. — Le passage du *Plasmodium* dans les œufs n'est pas constaté. — Des *Culex*, nés de Moustiques infectés, ne se sont pas montrés infectants [1].

VI. — Pas d'immunité acquise chez les Moustiques. — Des *Culex* ayant cessé d'être infectants se réinfectent après avoir sucé du sang à *Plasmodium* [1].

C. — TRYPANOSOME DU SANG DU CANARI

(*SERINUS CANARIUS* KOCH)

Un Canari né en cage, et ayant vécu 4 mois au laboratoire dans une cage recouverte de grillage à fines mailles, n'a jamais présenté d'éléments anormaux dans son sang à l'examen microscopique. Il se montre infecté le 18 juin 1912 de *Plasmodium relictum*, 8 jours après la piqûre d'un seul *Culex pipiens*

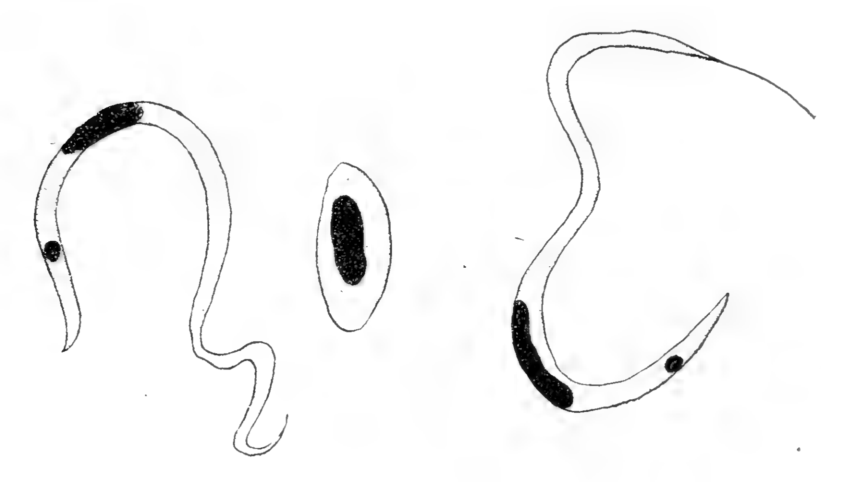


Fig. 2. — Trypanosome du sang du Canari.

infecté lui-même sur un Canari (race de *Plasmodium* conservée au laboratoire depuis 4 ans, par passages alternatifs *Canari-Culex*). Le 18 juin, quelques gouttes de son sang, ensemencées sur milieu NNN, donnèrent une abondante culture de Trypanosomes (fig. 2).

Les mouvements du Trypanosome en culture sont très vifs. Il traverse assez rapidement le champ du microscope (obj. à immersion 1/15). Le corps, fusiforme, présente deux extrémités effilées. Le cytoplasme se colore assez difficilement au Giemsa, à cause du milieu NNN. La membrane ondulante est très étroite. Le centrosome punctiforme (0 µ 7) est situé à peu près à égale distance de l'extrémité postérieure et du noyau. Celui-ci est allongé, mesure environ 2 µ 5 de longueur sur 1 µ de largeur. La partie libre du flagelle est très longue.

Dimensions en μ :

De l'extrémité postérieure au centrosome	3,6
Du centrosome au bord postérieur du noyau	3,6
Diamètre du centrosome	0,7
Du bord postérieur au bord antérieur du noyau . . .	2,5
Du bord antérieur du noyau à l'extrémité antérieure .	14,5
Flagelle libre	10,0
Longueur totale du trypanosome	24,9
Largeur maxima du corps	1,6

Les Trypanosomes ont apparu dès le lendemain de l'ensemencement; ils ont disparu au bout de 8 jours. Un premier repiquage sur NNN donna lieu à une culture peu abondante qui ne se reproduisit plus à la suite d'un deuxième repiquage.

L'inoculation intrapéritonéale de la culture à 3 souris ne donna aucun résultat.

L'inoculation intrapéritonéale de la culture à un Canari ne fut pas suivie d'infection sanguine. L'ensemencement sur NNN du sang de ce Canari inoculé ne donna pas de résultat.

D. — TRYPANOSOME DU SANG DU MOINEAU ALGÉRIEN

(*PASSER DOMESTICUS* LINNÉ)

Ce Trypanosome a été vu chez deux Moineaux algériens, sur plusieurs centaines examinés (*Passer domesticus* L.). Rare dans le sang périphérique, il est plus fréquent dans le sang du cœur. (Un Trypanosome a déjà été signalé chez *Passer domesticus* par Novy et Mac Neal, Bettencourt et França.)

Gros Trypanosome à mouvements assez vifs. Le corps élargi présente deux extrémités effilées. Le centrosome, très petit et punctiforme (0μ7) est situé très près de l'extrémité postérieure. Le noyau, volumineux, occupe la partie moyenne du corps. La partie libre du flagelle paraît extrêmement courte.

Dimensions en μ :

De l'extrémité postérieure au centrosome	0,5
Du centrosome au bord postérieur du noyau	4,5
Diamètre du centrosome	0,7
Du bord postérieur au bord antérieur du noyau . . .	5,5
Du bord antérieur du noyau à l'extrémité antérieure .	7,5
Flagelle libre	2,5
Longueur totale du trypanosome	21,2
Largeur maxima du corps	3,5

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA RAGE EN AFRIQUE OCCIDENTALE FRANCAISE

par F. HECKENROTH.

(Laboratoire de Bactériologie de l'A.O.F., à Dakar.)

L'existence de la rage chez le chien, en Afrique occidentale française, a été signalée : par Cazalbou (1), Bouffard (2), au Soudan ; Teppaz (3), Bourret (4), au Sénégal ; Aldigé (5), en Guinée. Ces auteurs, après avoir suivi chez le chien l'évolution de la maladie qui est une forme « de rage intermédiaire entre la forme furieuse et la forme paralytique, avec prédominance des phénomènes paralytiques » (Aldigé), ont, pour la plupart, réussi à transmettre au lapin, au chien, au cobaye, par inoculation intracérébrale ou intraoculaire d'émulsion de bulbe de « chien fou », une affection qui, par son évolution, rappelle la rage expérimentale chez ces animaux et se termine, en 3 ou 4 semaines, par la mort en pleine paralysie.

Bouffard fut le premier à montrer, au cours d'expériences effectuées au Soudan, en 1909, que la maladie était transmissible en série au lapin, avec ces particularités que l'inoculation était assez variable (de 15 à 20 jours habituellement, jusqu'à 35 à 38 jours), et qu'un lapin sur six se montrait résistant au virus. Cet auteur signalait en même temps que la rage canine au Soudan ne paraissait pas transmissible à l'homme dans la nature, puisqu'on n'observait aucun cas de rage humaine dans ce pays où le « chien fou » est loin d'être une rareté. Cette

(1) Cazalbou, *Notes de pathologie exotique*, p. 91.

(2) G. Bouffard, Sur l'existence de la rage canine dans le Haut-Sénégal et Niger. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, 25 septembre 1912.

(3) L. Teppaz, Un cas de rage du chien au Sénégal. *Bull. Soc. path. exotique*, 1910, p. 331.

(4) G. Bourret, Documents non publiés, existant aux Archives du Laboratoire de bactériologie de l'A.O.F.

(5) Aldigé, Rapport existant aux Archives du Service vétérinaire de l'A.O.F.

rage du chien n'était pas davantage considérée comme transmissible à l'homme au Sénégal, en Guinée, au Dahomey, et nous avions déjà noté ce fait dès 1903, au pays haoussa, à Zinder Tchad.

Pourtant, en dépouillant, en 1915, les archives du Service de Santé de l'Afrique occidentale française de ces trente dernières années, nous avons trouvé relaté, dans un rapport mensuel du médecin-major Cavasse (1), une observation très complète de rage humaine se rapportant à un garde-cercle indigène, évacué de Kadé, village de Guinée situé à 400 kilomètres de la côte, pour morsure suspecte et hospitalisé à l'hôpital de Konakry. Mordu à la face, le 24 septembre 1912, par un chien errant, le malade présenta les premiers troubles dysphagiques le 30 octobre et mourut le 4 novembre (41 jours après la morsure), après avoir montré tous les signes cliniques d'une rage typique. Cette observation, qui n'a jamais été publiée, devait être mentionnée, car elle rapporte le seul cas de rage humaine connu en Afrique occidentale française jusqu'en 1915.

Jusqu'à cette date, six cas de rage canine seulement ont été suivis et contrôlés dans cette Colonie. Ce fait s'explique par les difficultés que l'expérimentateur rencontre dans ce pays où l'insouciance du noir et le manque de communications rapides ne sont pas les moindres obstacles.

C'est grâce à la situation du laboratoire de Dakar, placé à l'extrémité de deux lignes de chemin de fer, à l'utilisation du téléphone et de courriers spéciaux, mis à notre disposition par l'Administration de la Colonie, que nous avons pu, en 1915 et en 1916, nous livrer à une enquête intéressante sur la rage du Sénégal et à quelques recherches anatomo-pathologiques qui n'avaient pas encore été faites.

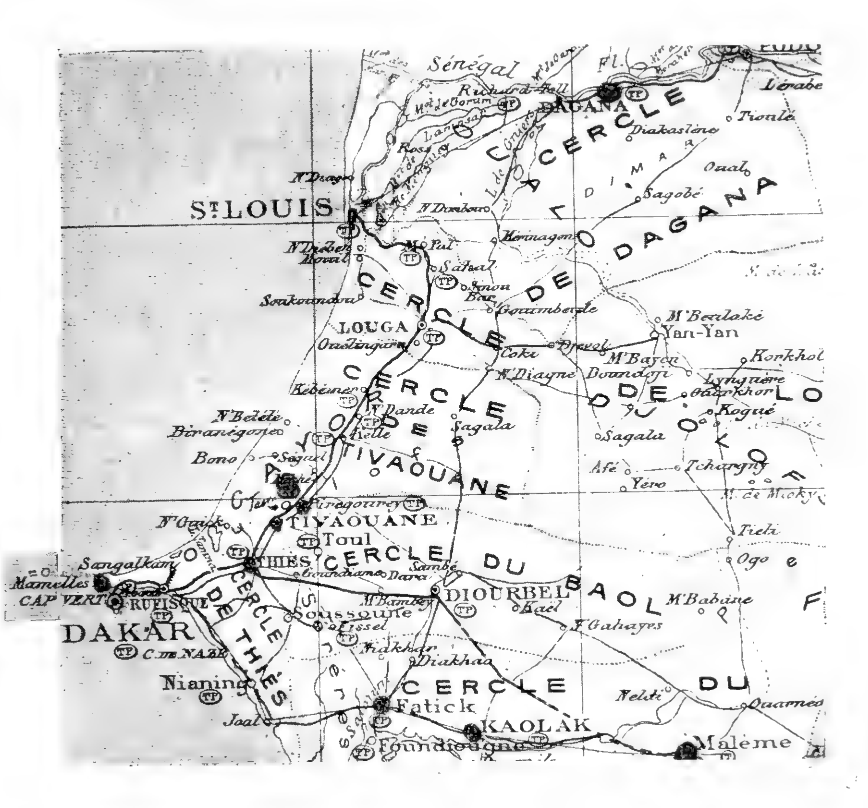
Nous avons été amené à entreprendre ce travail à l'occasion du décès, à Fatick, de 5 indigènes mordus un mois et demi auparavant par un chien indigène errant (2).

(1) CAVASSE, Rapport du mois de novembre 1912. Hôpital indigène de Konakry (Guinée).

(2) Nous remercions nos confrères Jouenne, Louÿs, Kerneïs, Lenoël, De Combarel, Ninaud, A. Leger et M. le vétérinaire Aldigé pour la complaisance avec laquelle ils ont facilité nos recherches en nous adressant des animaux suspectés de rage ou des renseignements utiles.

Du mois de juillet 1915 au mois de juillet 1916, 12 chiens ndigènes, 3 chiens européens, 1 chacal sauvage, nous ont été signalés ou adressés comme suspects de rage. Ils ont été rencontrés dans les agglomérations de :

Fatick, Lyndiane, Sinthiou, Malème (Cercle du Sine Saloum);
Tivaouane, Mekhé, Piregourey, Taoua (Cercle de Tivaouane);



Thiès (Cercle de Thiès);
Dagana (Cercle de Dagana);
Ouakam (près Dakar).

Sur ces 16 animaux : 2 ont réussi à s'enfuir; 7 ont été abattus; 7 ont succombé à leur affection.

Les chiens abattus étaient, pour la plupart, des chiens errants; ils ne présentaient aucun signe apparent de paralysie, mais, furieux ou tristes, ils mordaient hommes et chiens sur leur passage.

L'évolution de la maladie a pu être suivie sur 6 chiens et 1 chacal. 6 de ces animaux sont morts après avoir montré de la tristesse, de l'excitation, de la modification de la voix. Dans 4 cas, il y a eu morsure à l'homme ou au chien, et la paralysie a été observée 5 fois. Pour 2 chiens, nous n'avons pu obtenir de renseignements sur ce dernier point.

Les 16 petites enquêtes entreprises, dans les villages où la présence d'un animal suspect de rage avait été signalée, ont donné les résultats suivants : 3 fois, on n'a pu établir si le chien malade avait mordu des bêtes ou des gens; 5 fois, la morsure a été notée chez l'homme seulement; 4 fois, chez le chien seulement; 4 fois, chez l'homme et le chien.

Morsure a l'homme.

Huit chiens et un chacal ont mordu l'homme (Européens ou indigènes).

Deux chiens ont fourni une inoculation positive : la morsure du premier chien a été l'origine, sur 12 personnes mordues, de 5 cas de rage diagnostiqués cliniquement (cas de Fatick); la morsure du deuxième chien a causé 1 cas de rage, diagnostiqué cliniquement, qui s'est produit 33 jours après l'accident, chez un indigène mordu à la face, et qui avait été mis au traitement antirabique dès le 7e jour (cas de Piregourey).

Trois chiens n'ont provoqué par leur morsure aucun trouble, après plus de 8 mois d'observation, chez des personnes ayant refusé ou n'ayant pas suivi le traitement antirabique.

Trois chiens et *un chacal*, enfin, n'ont occasionné aucun accident, après plus de 8 mois, chez des personnes mordues, mais ayant suivi le traitement antirabique.

Le nombre exact des individus mordus par des chiens suspects n'est pas connu. On sait seulement qu'il y a eu une trentaine de victimes : 6 Européens, et AU MOINS 25 indigènes. 7 ont suivi le traitement antirabique et fourni 1 cas de rage. Si, des 23 personnes qui n'ont pas été soumises au traitement, on défalque les 5 cas de rage de Fatick et les 7 indigènes de ce village qui n'ont pas été contaminés par la morsure du chien enragé, il reste 11 personnes mordues par 3 chiens desquels on peut dire seulement qu'ils étaient suspects de rage, car pour

2 d'entre eux les examens de laboratoire n'ont pu être faits, et pour le 3e, ils n'ont apporté aucun renseignement positif.

Les 6 cas de rage constatés chez l'homme ont été suivis par des médecins, mais, dans aucun cas, nous n'avons pu nous procurer des pièces anatomiques de contrôle.

Morsure aux animaux.

Huit chiens suspects de rage ont roulé et mordu d'autres animaux, presque toujours des chiens.

Dans un cas, nous n'avons pas su ce qu'étaient devenus les animaux mordus.

Dans deux cas, tous les chiens mordus ont été abattus aussitôt.

Dans deux cas, il n'y a pas eu de transmission par la morsure chez 2 chiens, après plus de 3 mois d'observation. Dans un de ces cas, un chat tigré apprivoisé, mordu le même jour qu'un des chiens, mourut, 3 semaines plus tard, paralysé. Son cerveau, reçu au laboratoire plus de 8 jours après la mort, était inutilisable.

Dans trois cas enfin, 6 chiens mordus ont présenté soit de la tristesse, de l'agitation, de l'hébétude, de la modification de la voix, soit de la paralysie. L'un d'eux, devenu très irritable, a même mordu son maître, qui a refusé le traitement antirabique, et n'a présenté aucun trouble après plusieurs mois d'observation. (Ce cas de morsure chez l'homme ne figure pas parmi les 9 cas de morsure dont il a été question plus haut.)

Ces 6 chiens ont tous été abattus, sauf 1, écrasé par un train 3 jours après le début (?) de sa maladie. Nous n'avons pas eu l'occasion d'examiner leurs cadavres.

RECHERCHES DE LABORATOIRE

10 fois nous avons reçu, à Dakar, la tête ou le corps d'animaux suspects, mais les conditions d'expédition ont, le plus souvent, été mauvaises, par suite de la chaleur élevée, la lenteur du voyage, etc.

Quatre cerveaux en assez bon état nous ont montré la présence

de corpuscules de Negri. Avec 2 de ces cerveaux, nous avons fait un passage intracérébral au lapin, et chaque fois nous avons transmis la rage.

Dans 6 cas, les cerveaux étaient en état de putréfaction avancée ; aussi, la recherche des corpuscules de Negri a-t-elle été impossible 2 fois ; 2 fois, elle est restée négative ; 2 fois, elle a été positive.

Malgré le mauvais état de ces cerveaux, nous en avons utilisé 5 pour inoculer le lapin. Cette inoculation était faite avec un fragment de bulbe ayant au préalable séjourné dans la glycérine, en glacière, pendant une à deux semaines.

1° Deux cerveaux ont permis une inoculation positive : dans l'un, les corpuscules de Negri avaient été décelés ; dans l'autre, cette recherche n'avait pas été pratiquée. Les coupes de corne d'Ammon des lapins inoculés ont laissé voir des corpuscules de Negri.

2° Un cerveau, où les corpuscules de Negri avaient été trouvés nombreux, a été inoculé au lapin, sans succès.

3° Deux cerveaux, l'un sans corpuscules de Negri, l'autre non examiné, ont causé la mort de 2 lapins, sans paralysie, au 30e jour. Les animaux avaient seulement maigri considérablement. Leurs cornes d'Ammon et ganglions spinaux ont été examinés sans résultat. Un deuxième passage, tenté avec le cerveau d'un de ces lapins, est resté négatif, et le lapin de deuxième passage a pu être inoculé avec succès 90 jours plus tard avec du virus rabique provenant du Sénégal.

La recherche du sucre dans les urines n'a pu être faite que chez 2 animaux (1 chien, 1 chacal), incontestablement enragés. Elle n'a été positive que chez le chien.

LE VIRUS RABIQUE DU SÉNÉGAL SUR LE LAPIN

Nous avons tenté, en octobre 1915, un premier essai de passage du virus rabique du Sénégal en série chez le lapin. Le premier lapin de passage mourut paralysé 20 jours après l'inoculation, mais le deuxième passage échoua par suite de la mort, en moins de 24 heures, des 2 lapins injectés. La constatation de nombreux coccobacilles dans les capillaires du cerveau du lapin n° 1

expliqua ce double échec. Cet animal, dont les cornes d'Ammon renfermaient de non rares corpuscules de Negri, était à la fois atteint de rage et de pasteurellose.

Son cerveau, conservé à la glacière, en glycérine, servit à faire, le 11e et le 17e jour, sur le lapin, 2 passages qui restèrent négatifs. Les 2 lapins, réinoculés avec du virus rabique du Sénégal (virus Meckhé) 196 et 205 jours plus tard, ont contracté la rage.

Notre deuxième essai de passage a été fait le 24 décembre 1915 avec un bulbe de chien reçu le 22 décembre de Meckhé et mis pendant 48 heures en glycérine. Depuis cette date, le virus continue à être régulièrement entretenu, sur lapin, au laboratoire de Dakar, par inoculation intracérébrale.

Nous avons pu effectuer les 13 premiers passages qui nous ont permis les constatations suivantes :

1° L'incubation de la maladie a été de 11 à 15 jours (moyenne 12 jours), et la mort est survenue du 13e au 21e jour (au 17e jour, en moyenne).

2° Le poids de l'animal n'a pas paru influer sur la durée de l'évolution de la maladie. C'est ainsi qu'un lapin de huitième passage, de 2.730 grammes, meurt en 13 jours et demi, tandis qu'un lapin de sixième passage, de 2.000 grammes, meurt en 21 jours. Un lapin de quatrième passage, de 2.750 grammes, meurt en 15 jours. Un lapin de quatrième passage, de 2.790 grammes, inoculé au même moment et avec la même émulsion, meurt seulement le 21e jour.

3° La perte de poids subie par les animaux inoculés a été de 15 à 30 p. 100. Elle est généralement plus élevée lorsque la mort est retardée.

4° Le virus ne paraît avoir aucune tendance à se fixer.

5° Sur 25 lapins de passage, 1 s'est montré résistant au virus. Nous avions déjà noté cette résistance chez 2 lapins avec notre virus d'octobre 1915.

6° Cette résistance n'a été que passagère, car une réinoculation faite 62 jours plus tard, avec le même virus, a été positive.

7° Des coupes de corne d'Ammon ont été pratiquées chez 8 lapins de passage. 6 fois on a trouvé des corpuscules de Negri.

CONSIDÉRATIONS D'ENSEMBLE

La transmission, plusieurs fois obtenue, de la maladie du « chien fou » au lapin, par inoculation intracérébrale d'émulsion de bulbe de l'animal suspect, la possibilité de transmettre cette maladie en série chez le lapin, la mise en évidence de corpuscules de Negri dans les cellules pyramidales de la corne d'Ammon de plusieurs chiens et d'un certain nombre de lapins de passage, sont des résultats qui corroborent les travaux des auteurs qui se sont déjà occupés de la rage en Afrique occidentale française. La rage canine existe indiscutablement au Sénégal.

La rage humaine s'y rencontre aussi, comme le montrent les observations de Fatick et de Piregourey, qui sont à rapprocher de celle de Madé, en Guinée.

Cette constatation nouvelle nous conduit à l'hypothèse de l'existence, au Sénégal, d'un virus rabique d'importation récente, expliquant les cas de contagion humaine enregistrés en 1915, à côté d'un virus rabique indigène, anciennement observé, identique à celui du Soudan dont il présente les caractères, en particulier celui de ne pouvoir être transmis par la morsure du chien à l'homme. Cette dernière propriété, reconnue au virus du Sénégal jusqu'en 1915, a été affirmée pour lui, comme pour le virus du Soudan, d'après une documentation établie par les relations des indigènes, quelques rares observations d'Européens, et des statistiques médicales qui ne portent que sur les noirs approchant le médecin. Le nombre considérable de chiens introduits sans surveillance au Sénégal, par les voyageurs noirs ou blancs, arrivant d'Europe ou des colonies voisines, plaide en faveur de l'hypothèse de l'importation récente d'un virus rabique étranger.

Cette hypothese, toutefois, ne va pas sans une certaine réserve. Elle doit expliquer, en effet, le cas de rage humaine de Madé, cas exceptionnel puisqu'il n'en avait jamais été constaté avant 1912, en Guinée, et qu'il n'en a pas été constaté depuis cette date.

Il est assez improbable que le chien porteur de virus rabique étranger n'ait transmis sa maladie à aucun chien, dans un pays

où les chiens errants sont en nombre considérable, et où la rage canine est aussi fréquente qu'autrefois.

Un autre argument, à l'encontre de notre hypothèse, peut être tiré du fait que nous n'avons jamais rencontré de lapin résistant au virus fixe de l'Institut Pasteur entretenu au laboratoire de Dakar, tandis que le virus isolé en 1915 au Sénégal et celui du Soudan, entre les mains de Bouffard, ne se sont pas toujours montrés virulents pour le lapin. Sur 27 lapins, inoculés par nous dans de bonnes conditions, avec des cerveaux frais, et contenant des corpuscules de Negri, 3 se sont montrés réfractaires, soit : 1 sur 9. Proportion notée par Bouffard : 1 sur 6.

Peut-être cette constatation autorise-t-elle un rapprochement entre les deux virus, rapprochement qui fait alors penser à la possibilité, pour le virus autochtone de l'Afrique occidentale française, normalement dépourvu de virulence vis-à-vis de l'homme, de devenir dangereux pour celui-ci à un moment donné, sous certaines influences qui nous échappent (peut-être le passage renouvelé du virus sur chiens d'Europe).

Nous avons signalé que notre virus Meckhé ne montrait aucune tendance à se fixer. Bouffard a fait la même remarque pour le virus du Soudan. Il ne faut pas voir là un nouvel élément de rapprochement entre les 2 virus. Nous retrouvons, en effet, les mêmes variations dans les périodes d'incubation avec le virus fixe de Paris entretenu à Dakar.

Ce virus, qui tue à Paris le lapin en 11 et 12 jours, a causé la mort de 53 lapins :

1 fois.	en 12 jours	7 fois	en 17 jours
3 fois.	en 13 jours	7 fois	en 17 jours
7 fois.	en 14 jours	2 fois	en 19 jours
12 fois.	en 15 jours	1 fois	en 55 jours
13 fois.	en 16 jours		

CONCLUSIONS

Nos recherches sur la rage au Sénégal aboutissent à deux constatations dont l'importance n'est pas négligeable, au point de vue prophylactique :

La rage canine existe au Sénégal : la preuve expérimentale et microscopique de cette affection a été faite.

La maladie peut être transmise à l'homme par la morsure du chien malade.

Nous pensons qu'on rencontre au Sénégal, comme au Soudan, un virus rabique normalement non transmissible à l'homme.

Il n'est pas possible d'affirmer que c'est le virus que nous avons eu entre les mains.

L'hypothèse d'un virus d'importation récente, vivant à côté du virus propre au pays, est admissible.

Jusqu'ici, rien n'est venu démontrer que le virus indigène n'est pas capable, sans certaines conditions encore inconnues, de devenir virulent pour l'homme.

TROIS OBSERVATIONS
D'UNE AFFECTION NON CLASSÉE DU CHIEN
AU SÉNÉGAL

par F. HECKENROTH.

(Laboratoire de Bactériologie de l'A. O. F., à Dakar.)

Nous avons observé au Sénégal, en 1916, une affection du chien assez particulière pour que nous n'ayons pu la faire entrer dans le cadre nosologique d'aucune maladie connue chez cet animal.

Certains de ses symptômes, tels que les troubles de la marche, la salivation abondante, la tristesse, les accès de fureur, ont pu faire songer à la rage comme le fait s'est produit pour un chien indigène de Kaolack qui, *brusquement*, le 1er juin, montre quelque hésitation de la marche; le 5, ne peut se lever et présente de la bave à la gueule; le 6, cesse de s'alimenter, et le 8, meurt complètement paralysé. Le même diagnostic a été appliqué encore à un chien fox de Rufisque qui, le 12 juillet, paraît triste et irritable, mord plusieurs chiens qu'on abat, sauf 2 et succombe trois jours plus tard. L'animal, qui a été isolé, était assis sur son arrière-train deux heures avant sa mort.

La mort suspecte de ces deux animaux nous a valu de recevoir quelques jours plus tard : de Kaolack, 1 chien errant, et de Rufisque, les 2 chiens mordus le 12 juillet et non abattus.

Ces 3 chiens ont été mis en observation *pour rage* au laboratoire et y sont morts après avoir présenté divers symptômes dont quelques-uns se retrouvent chez les trois animaux.

Nous donnons par le détail nos observations dans l'espoir qu'elles provoqueront la publication de documents analogues recueillis en Afrique occidentale française.

Chien de Kaolack.

Ce chien, fox terrier adulte, est étranger au village. Il est trouvé errant le 14 juin sur la voie publique. Comme il est atteint de troubles de la marche, il nous est adressé comme suspect de rage. Il arrive le lendemain soir et fait aisément et sans troubles de la marche le trajet de la gare au laboratoire, soit 3 kilomètres. L'animal, dont le regard manifeste quelque inquiétude, mange et boit.

Les 16 et 17 juin, même état.

Le 18, le fox « titube » en marchant et présente du tremblement généralisé qui dure 24 heures. Même inquiétude du regard. L'animal s'alimente bien.

Le 19, indifférent à ce qui se passe autour de lui, il reste couché tout le jour. Il ne se lève pas quand on l'appelle. Il a des soubresauts des massèters qui font s'entre-choquer les dents. Les commissures labiales sont, par moment, fortement attirées en arrière par des contractions musculaires.

Les 20 et 21, une salivation *extrêmement abondante* se produit; l'état reste le même.

Le 22, l'animal parvient à plusieurs reprises à se mettre sur ses pattes. Dans cette position, le corps est arqué et paraît reposer presque entièrement sur les membres antérieurs. Contractures passagères de 2 à 3 minutes des masses musculaires des membres postérieurs. La salivation a cessé. L'animal ne s'alimente pas.

Les 23 et 24, même état; cependant le chien boit et mange un peu.

Le 25, l'œil est meilleur, mais l'animal reste couché. On essaie vainement de le mettre debout; ses quatre membres paraissent paralysés.

Les 26 et 27, même état.

Le 28, réapparition du tremblement généralisé déjà noté.

Le 18, ce tremblement persiste les jours suivants.

Le 29, on réussit à mettre l'animal sur ses pattes, mais cette fois ses membres antérieurs sont incapables de supporter son poids et il tombe. Les membres postérieurs semblent avoir retrouvé leurs forces.

Au cours d'un nouvel essai, fait pour le relever, le chien mord le bâton qu'on glisse sous lui.

Le 30, l'animal se met debout de lui-même, mais il se fatigue vite et tombe, les membres antérieurs fléchissant les premiers. Il s'alimente. Apparition de contractures dans les muscles du cou. La tête qui est pendante est fortement attirée vers les épaules toutes les 2 ou 3 minutes.

Le 1er juillet, l'animal, qui reste couché, mord le bâton avec lequel on veut le soulever. Mis sur ses pattes, il n'utilise guère pour conserver l'équilibre que les membres antérieurs qu'il dispose de manière à supporter tout le poids du corps. Il s'aide de son museau qu'il appuie par terre. Dans cette position, les membres postérieurs touchent à peine le sol, le dos est fortement voûté et l'arrière-train subit une torsion très marquée par rapport au plan vertical; le chien tombe d'ailleurs rapidement sur le sol. Il commence à maigrir.

Le 3, l'animal ne s'alimente plus. Mis sur les pattes, il s'affaisse aussitôt. Les contractures persistent.

Jusqu'au 7 juillet, même état. Soubresauts fréquents des muscles. L'animal peut encore relever la tête. L'amaigrissement s'exagère.

Le 8, la paralysie est complète.

Les 9 et le 10, même état. On note des soubresauts constants du larynx, qui monte et descend à la façon d'un piston de pompe.

Le 11, mort à 6 heures, après 27 jours de maladie.

Chiens de Rufisque.

Ces 2 chiens, fox terriers adultes, vivaient depuis plusieurs années avec le chien qui les a mordus le 12 juillet.

Chien I. — Il montre de la tristesse le 27 juillet et reste couché tout le jour. Il refuse sa nourriture.

Le 28, même état. Le regard est indifférent.

Le 29, on constate de la paralysie des membres. L'animal, relevé avec un bâton, n'essaie pas de se servir de ses pattes. Il mange deux morceaux de viande qu'on lui présente.

Le 30, il est trouvé mort, le matin.

Chien II. — Le 27 juillet, il montre une légère faiblesse du train postérieur.

Le 28, cette faiblesse est plus accusée. Au bout de quelques minutes de station debout, l'animal « tombe » assis. Il mange peu.

Le 29, le chien mange bien. La faiblesse des membres postérieurs est moins marquée. L'animal se tient plus longtemps sur ses pattes; mais, dans la station debout, déplaçant son centre de gravité, il porte tout le poids du corps sur les membres antérieurs.

Le 30, l'œil est hagard. Le chien se lève à l'appel, mais les pattes postérieures, sans forces, glissent en arrière et l'animal tombe sur le grasset. Il ne touche pas à sa nourriture.

Le 31, au matin, les troubles sont plus accusés que la veille; dans l'après-midi au contraire, l'animal va mieux et se met debout. Il reste sur ses pattes assez longtemps.

Le 1er août, comme la veille, même état médiocre le matin; le soir, amélioration.

Le 2, le mieux se maintient. L'œil est moins hagard. Les forces paraissent revenir dans les membres. L'animal ne se fatigue qu'après 5 à 10 minutes de station debout.

Jusqu'au 7, on note ainsi des alternatives durant lesquelles les phénomènes morbides s'exagèrent ou s'amendent. A cette date, l'animal maigrit nettement. La faiblesse des membres postérieurs réapparaît. Des contractions des muscles de la nuque et du dos se manifestent; elles sont douloureuses. Refus des aliments et boisson.

On met à profit l'irritation que la vue d'un singe produit chez le fox pour le faire mordre deux Cercopithèques patas aux pattes. Le fox mord avec difficulté : il a peu de forces dans les mâchoires.

Le 8, les troubles s'exagèrent. L'animal ne peut se lever. Il présente, par crises, des contractures fréquentes, mais courtes, des muscles, des membres, du dos, de l'abdomen. A chaque contracture, l'animal gémit douloureusement. La respiration est accélérée.

Le 9, le chien qui ne cesse de gémir est étendu sur le ventre. Les membres sont entièrement paralysés. Les contractures ont cessé. Respiration rapide (38 M. R.) bruyante. Mort à 15 heures, après 14 jours de maladie.

A aucun moment, l'animal n'a présenté de bave à la gueule. Aucun gonflement articulaire.

RECHERCHES DE LABORATOIRE

1° Nous avons fait des coupes des cornes d'Ammon du chien mordeur de Rufisque : pas de corpuscules de Negri.

2° Le chien de Kaolack a montré seulement, à l'autopsie, une congestion intense des méninges. Pas de corpuscules de Negri dans les frottis et les coupes de cerveau.

Un passage intracérébral d'émulsion de bulbe a été fait, le 11 juillet, à deux jeunes lapins :

L'un, qui n'a manifesté aucun trouble, maigrit au commencement du mois de septembre et meurt *cachectique* le 14, sans avoir montré de paralysie. Il n'a pas cessé de s'alimenter jusqu'à la veille de sa mort. Perte de poids : 34,7 p. 100.

L'autre, qui paraît jusqu'au 26 juillet en parfait état, montre à cette date du tremblement; il ne se déplace que si on le pousse; il marche en sautillant comme mû par un ressort. Il tombe facilement et ne mange pas. Au bout de trois jours, le tremblement diminue, mais la tête est presque constamment contracturée et renversée en arrière. L'animal ne change de place que si on le chasse. Il se sauve par bonds désordonnés et roule fréquemment sur le sol. Il recommence à s'alimenter.

Même état jusqu'au 4 août. A ce moment, l'animal mange bien ; il perd encore facilement l'équilibre.

Pendant les 12 jours qui suivent, les troubles de l'équilibre disparaissent, mais l'animal commence à maigrir.

Il meurt *cachectique* le 18 août, sans avoir fait de paralysie. Il a perdu 830 grammes, soit 47,9 p. 100 de son poids.

A l'*autopsie* : méninges congestionnées ; aucune lésion macroscopique du cerveau. Pas de corpuscules de Negri.

Deux passages intracérébraux sur lapin restent négatifs.

3° Le chien I, de Rufisque, ne montre rien de particulier du côté des différents organes. L'estomac contient de la paille.

Les méninges sont très congestionnées. Pas de corps de Negri à la coupe des cornes d'Ammon. On ne fait pas de passage.

Le chien II, de Rufisque, est autopsié quelques minutes après la mort. Pas de sucre dans les urines. Rien du côté des viscères

abdominaux et thoraciques. Nombreuses plaques ecchymotiques de la peau vue par la partie profonde.

Congestion interne du cerveau. Le liquide céphalo-rachidien est clair, très abondant. La moelle est d'apparence normale. Les frottis et les coupes de bulbe, cervelet, corne d'Ammon, écorce, ne montrent pas de corps de Negri. La moelle, prélevée en plusieurs endroits, ne présente également rien de particulier, sauf dans un segment où les cellules nerveuses montrent quelques éléments très petits (1/5 de μ), colorés en rouge par le procédé de Baschieri, et pareils à quelques-uns de ceux que nous trouvons également dans les ganglions spinaux.

Les ganglions spinaux contiennent en effet, dans les cellules nerveuses qui sont, les unes pâles, les autres fortement colorées, des inclusions de taille variable, toujours assez petites, de 0 μ 2 à 3 μ, à bords parfois découpés, irréguliers, donnant à l'inclusion un aspect bi- ou trilobé. Ces inclusions, colorées en rouge vif par le « Baschieri », sont le plus généralement situées dans le voisinage du bord ou dans les prolongements protoplasmiques de la cellule, se détachant nettement sur la coloration bleue de cette cellule. Ils sont souvent entourés d'une auréole non colorée. Les inclusions les plus grosses sont rares dans une même cellule, 1, 2, 4; les plus petites, à peine visibles parfois, sont plus nombreuses.

Certaines cellules de ganglions ne montrent pas leur noyau; d'autres ont un noyau en dégénérescence; d'autres enfin paraissent normales. Les corps que nous venons de décrire peuvent se rencontrer dans les unes comme dans les autres.

Nous les avons vainement cherchés dans la moelle et les ganglions spinaux de 4 chiens normaux.

Un passage intracérébral a été fait sur 2 lapins le 10 août. L'un d'eux est demeuré bien portant, l'autre est en bonne santé apparente jusqu'au 24 août. Le 27, il reste dans le coin de sa cage et ne mange pas. Il est trouvé mort le 28. Pas de perte de poids. Rien aux différents organes. Pas de septicémie du lapin.

Le cerveau est mou, facilement déchirable. Pas de corps de Negri à la coupe de la corne d'Ammon et d'un morceau d'écorce cérébrale.

On fait, le 28 août, un passage intracérébral sur 2 lapins qui restent bien portants.

Les deux Cercopithèques (palas), que l'on a fait mordre le 7 août, n'ont présenté aucun phénomène anormal après plus de 8 mois d'observation.

* * *

Les 3 observations qui précèdent doivent être rapprochées des renseignements que nous avons recueillis sur la maladie des deux chiens que nous citions au début de cette note.

On voit que, dans les 5 cas, l'affection du chien a été mortelle. Comptée à partir de l'apparition des premiers troubles, l'évolution a duré de 3 à 27 jours.

L'affection semble se manifester au début par une modification du regard et des phénomènes paralytiques, plus ou moins accusés du côté des membres, ces phénomènes pouvant s'accompagner de contractures. Dans le cas du chien mordeur de Rufisque, la paralysie ne semble pas avoir existé, du moins pour les membres antérieurs, l'animal ayant été trouvé assis 2 heures avant sa mort.

Une salivation abondante a été notée deux fois, et dans 2 cas encore où la maladie a évolué lentement, on a vu, à plusieurs reprises, les troubles nerveux s'amender pendant quelques heures ou quelques jours, et l'état général devenir meilleur à ce moment.

L'animal paraît susceptible de pouvoir s'alimenter jusqu'à une période très avancée de la maladie.

On ne peut dire si l'affection que nous avons observée chez le chien est contagieuse ; si elle est transmise par un insecte piqueur ou tout simplement par la morsure d'animal à animal. Ce dernier mode de contamination peut avoir été réalisé pour le cas des chiens I et II de Rufisque qui, mordus le 12 juillet, ont montré tous deux 15 jours plus tard les premiers signes de l'affection.

Les examens de laboratoire, qui ont été seulement orientés du côté de la recherche de la rage, n'ont donné à ce point de vue aucun résultat positif : la recherche des corpuscules de Negri dans les cornes d'Ammon, pratiquée chez 4 chiens, a été négative. Il est vrai que, dans la rage paralytique, il n'est pas rare de n'en point trouver dans cette partie du cerveau et qu'il

faut alors les chercher dans les ganglions spinaux et la moelle (1). Nous n'avons fait cette recherche que pour le chien II de Rufisque, et nous avons dit qu'il existait, dans les cellules nerveuses des ganglions spinaux de cet animal, des inclusions cellulaires fortement colorées en rouge par la méthode de Baschieri. Que ces corps soient les « esphérulas » décrits par Athias (2) et Cesa Bianchi (3) chez le chien, le lapin et le cobaye; le pigment jaune de la cellule nerveuse qui se colorerait bien par l'éosine, ou de véritables petits corpuscules de Negri, nous nous bornons à signaler leur présence sans en chercher l'interprétation jusqu'à plus ample informé.

La mort de 3 lapins, sur 4 inoculés avec une émulsion de bulbe de chien malade, mérite également d'être retenue.

CONCLUSIONS

Nous attirons l'attention sur l'existence au Sénégal d'une affection, peut-être nouvelle du chien, non signalée jusqu'ici et qui se manifeste essentiellement par des troubles nerveux aboutissant à la mort.

Cette affection, par certains points, rappelle la rage dont elle pourrait être une manifestation atypique.

La question soulevée par nos observations reste entière.

(1) Mme Lina Negri-Luzzani, Le diagnostic de la rage. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1913, n° 11, p. 907.

(2) Athias, *Anatomia da cellula nervosa*. Lisboa, 1905.

(3) Cesa Bianchi. Le inclusioni del protoplasma della cellula nervosa gangliare. *Archivio di anat. et di fisiologia*, vol. VI, 1907.

SUR LA PRÉSENCE DU VIRUS RABIQUE DANS LA RATE

par P. REMLINGER.

Babès est — à notre connaissance — le seul expérimentateur qui soit parvenu à reproduire la rage en partant de la rate. Encore n'y est-il arrivé qu'une fois : « Dans un cas, dit-il (1), sur six lapins un seul, inoculé avec de la rate d'un lapin succombé au virus de passage, meurt de la rage après 14 jours. » Par ailleurs, la présence dans la rate de nodules irritatifs et parfois même nécrotiques trouvés dans certains cas de rage de l'homme ou des animaux a amené cet auteur à supposer que cet organe renfermait parfois le virus et que celui-ci était susceptible d'y produire des lésions analogues à celles des centres nerveux. A cette exception près, toutes les indications qu'on trouve dans la littérature médicale sont d'ordre négatif.

Nous avons appliqué à l'étude de cette question la technique suivante :

La rate entière d'un cobaye mort de la rage des rues est émulsionnée finement dans de l'eau physiologique et injectée à la dose maxima compatible avec ce mode d'inoculation (1/4 à 1/2 cent. cube) sous la dure-mère d'un jeune cobaye, cependant que le surplus de l'émulsion est injecté entièrement dans les muscles de la nuque. Choix de l'animal (le cobaye est, comme on sait, sensiblement plus réceptif à la rage que le lapin); jeune âge du sujet, sévérité des deux modes d'inoculation ; dose du produit inoculé; virus même, ayant presque toujours passé un nombre considérable de fois par le cobaye, c'est-à-dire adapté à son organisme, tout concorde ainsi à favoriser la réussite de l'expérience. De fait, les résultats obtenus ont été les suivants :

Une première série de recherches a été effectuée dans les

(1) BABÈS, *Traité de la Rage*. Paris, 1912, p. 273.

conditions habituelles de la pratique des laboratoires, sans se préoccuper de l'heure exacte à laquelle était survenue la mort de l'animal, c'est-à-dire que les rates étaient inoculées de 1 à 12 heures après le décès :

Nº D'ORDRE	DATE	PROVENANCE DE LA RATE	ANIMAL INOCULÉ	MODE D'INOCULATION	RÉSULTAT
1	26 sept.	Cobaye autopsié de 1 à 16 heures après la mort.	Cobaye.	Cerveau et nuque,	A résisté.
2	28 sept.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
3	12 nov.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	Mort de rage.
4	17 nov.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
5	18 nov.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
6	11 déc.	*Id.*	*Id.*	Nuque seule.	Mort de rage.
7	13 déc.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
8	16 déc.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
9	17 déc.	*Id.*	*Id.*	Nuque seule.	A résisté.
10	18 déc.	*Id.*	*Id.*	Nuque seule.	A résisté.
11	25 déc.	*Id.*	*Id.*	Cerveau et nuque.	Mort de rage.
12	28 déc.	*Id.*	*Id.*	Cerveau et nuque.	A résisté.

3 fois sur 12 doses, l'inoculation au cobaye de la rate d'un autre cobaye mort de la rage a provoqué l'apparition de la maladie. Voici, détaillées, ces observations.

Obs. I. — Le 12 novembre 1916, un cobaye, inoculé sous la dure-mère avec un virus de rue ayant déjà passé dix fois par le cobaye, succombe à la rage comme l'ont prouvé les passages faits avec le bulbe. A l'autopsie, la rate est prélevée, émulsionnée finement dans 5 cent. cubes d'eau physiologique et injectée à la fois sous la dure-mère et dans les muscles de la nuque d'un jeune cobaye. Celui-ci se porte parfaitement jusqu'au 10 décembre (28e jour). A cette date, on le trouve le matin, triste, les poils hérissés, dyspnéique. Il présente un commencement de paralysie du train postérieur, qui va s'accentuant au cours de la journée. Mort le 11 au matin (29e jour). Le bulbe est inoculé dans le cerveau de deux cobayes. Ils succombent à la rage, l'un, le 5e, l'autre le 6e jour, ainsi que l'ont prouvé de nouveaux passages faits cette fois par le cerveau du lapin.

Obs. II. — Le 11 décembre, on inocule dans les muscles de la nuque d'un cobaye la rate finement émulsionnée d'un autre cobaye mort de la rage des rues (17e passage). Le 28 décembre (17e jour) au matin, l'animal est triste, apathique, dyspnéique. Il ne se déplace pas volontiers. Si on le force à se mouvoir, on constate de la difficulté de la marche. La rage paralytique paraît probable. On est un peu surpris de le trouver mort quelques heures plus tard. Ses aliments sont disséminés en grand désordre. Du sperme souille la face interne des cuisses et le sol de la cage en plusieurs endroits. Il semble avoir succombé au cours d'une crise furieuse. Un cobaye inoculé avec le

bulbe succombe le 7e jour à une rage typique. Nous devons insister sur ce que, dans cette expérience, la rate du cobaye rabique n'avait pas été inoculée à la fois sous la dure-mère et dans les muscles de la nuque du cobaye, mais dans ceux-ci seulement.

OBS. III. — Le 25 décembre, deux cobayes meurent de la rage des rues (20e et 25e passages). Les deux rates sont enlevées, émulsionnées finement et inoculées l'une et l'autre sous la dure-mère et dans les muscles de la nuque d'un même cobaye. Celui-ci demeure bien portant jusqu'au 10 janvier (16e jour). A cette date, il est trouvé mort le matin, sans que la veille aucun symptôme suspect ait été noté. L'autopsie ne montre aucune lésion pouvant expliquer le décès. Le bulbe est inoculé sous la dure-mère d'un lapin qui, le 17 janvier (7e jour), commence à présenter de l'instabilité de la démarche. Le lendemain, la paralysie est complète et la rage des plus caractéristiques. Mort le 19, au 9e jour.

En présence de ces résultats un peu inattendus, nous nous sommes demandé s'il ne fallait pas attribuer la réussite des inoculations au fait que les rates étaient enlevées après la mort de l'animal, quoique cependant un petit nombre d'heures après elle. Pour élucider ce point, douze cobayes ont été inoculés dans des conditions identiques aux précédentes (dure-mère et muscles de la nuque) avec cette seule différence que les cobayes rabiques étaient sacrifiés quelques heures avant le moment où leur mort se serait produite. Les résultats obtenus, absolument identiques aux précédents, sont consignés dans le tableau suivant :

N° D'ORDRE	DATE	PROVENANCE DE LA RATE	ANIMAL INOCULÉ	MODE D'INOCULATION	RÉSULTAT
1	19 déc.	Cobaye sacrifié avant la mort naturelle.	Cobaye.	Cerveau et nuque.	A résisté.
2	24 déc.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
3	29 déc.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
4	30 déc.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
5	31 déc.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	Mort de rage.
6	3 janv.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	Mort de rage.
7	5 janv.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
8	8 janv.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
9	10 janv.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
10	22 janv.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
11	31 janv.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	Mort de rage.
12	6 févr.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.

Trois fois sur douze donc — absolument comme dans la

série précédente — l'inoculation, à un cobaye, de la rate d'un cobaye rabique prématurément sacrifié a provoqué l'éclosion de la rage.

Obs. IV. — Le 31 décembre, un cobaye inoculé avec un virus de rue provenant d'un 20e passage est sur le point de succomber à la rage. On le sacrifie. Sa rate est émulsionnée dans 5 cent. cubes d'eau physiologique et inoculée à la fois sous la dure-mère et dans les muscles de la nuque d'un cobaye. Le 22 janvier (22e jour), celui-ci présente de la tristesse, de l'inappétence, du hérissement des poils, de la dyspnée. Le soir, il se couche sur le côté et entre en agonie. Il est sacrifié et son bulbe est inoculé sous la dure-mère d'un lapin. Le 30 janvier (8e jour), commencement de paralysie. Rage paralytique classique le lendemain. Mort le 1er février.

Obs. V. — Un cobaye atteint de rage des rues à la suite d'un 25e passage est sacrifié avant sa mort naturelle le 3 janvier. La rate est enlevée, broyée, émulsionnée et inoculée à la fois dans le cerveau et les muscles de la nuque d'un cobaye. Le 19 janvier (16e jour), l'animal paraissait très bien portant le matin. Le soir, il est trouvé mort sans que l'autopsie donne l'explication du décès. Un lapin est inoculé sous la dure-mère. Le 26 janvier (7e jour), il présente un commencement de paralysie rabique. Le lendemain, la paralysie est complète et la rage est caractéristique. Mort de rage le 28 janvier (9e jour).

Obs. VI. — Le 31 janvier, la rate d'un cobaye sur le point de mourir d'une rage à virus de rue (28e passage), est enlevée, émulsionnée et inoculée à la fois sous la dure-mère et dans les muscles de la nuque d'un cobaye. Le 11 février (11e jour), l'animal paraît suspect. Il se tient dans un coin de la cage les poils légèrement hérissés; il paraît triste et dyspnéique. Même état le lendemain. Inappétence absolue. Le surlendemain (13e jour), la démarche est hésitante; le train postérieur est parésié; la dyspnée s'accentue. Le soir, la paralysie s'étend aux membres antérieurs. L'animal a des mouvements de mâchonnement continuels. Il est trouvé mort le 14 au matin (14e jour). Son bulbe est inoculé sous la dure-mère d'un lapin. Le 21 février (7e jour), celui-ci présente les symptômes caractéristiques d'une rage paralytique à laquelle il succombe le surlendemain.

Une troisième série d'expériences a fourni en quelque sorte la contre-épreuve de la série précédente.

Douze cobayes ayant succombé à la rage des rues ont été laissés pendant 24 ou 48 heures à la température du laboratoire. A ce moment seulement, la rate a été prélevée, émulsionnée et inoculée dans les muscles de la nuque du cobaye, l'inoculation sous-dure-mérienne étant rendue impossible par la putréfaction commençante. Un seul animal a contracté la rage :

N° d'ordre	DATE	PROVENANCE DE LA RATE	ANIMAL INOCULÉ	MODE D'INOCULATION	RÉSULTAT
1	14 janv.	Enlevée 24 heures après la mort.	Cobaye.	Muscles de la nuque.	A résisté.
2	17 janv.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
3	23 janv.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
4	23 janv.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
5	23 janv.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
6	29 janv.	Enlevée 30 heures après la mort.	*Id.*	*Id.*	A résisté.
7	29 janv.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
8	31 janv.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
9	31 janv.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	Mort de rage.
10	5 févr.	Enlevée 48 heures après la mort.	*Id.*	*Id.*	A résisté.
11	5 févr.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.
12	11 févr.	*Id.*	*Id.*	*Id.*	A résisté.

Obs. VII. — Le 30 janvier, un cobaye succombe à une rage causée par le virus de rue et démontrée par les passages. L'inoculation du bulbe sous la dure-mère du lapin étant faite, le cadavre est abandonné pendant 30 heures à la température du laboratoire. Alors seulement, on enlève la rate, on l'émulsionne et on l'inocule dans les muscles de la nuque d'un cobaye. Le 16 février (16e jour), l'animal est triste et ne mange pas. Le soir, on constate que sa démarche est hésitante. Le lendemain (17e jour), les membres postérieurs et aussi, bien qu'à un moindre degré, les membres antérieurs son nettement paralysés. La rage paralytique est pure de tout mélange. Dans le courant de la journée, l'état s'aggrave lentement. L'animal est trouvé mort le 18 février au matin. Un lapin est inoculé sous la dure-mère avec son bulbe. Début d'une rage paralytique classique, le 28 février au 10e jour. Mort de rage le surlendemain.

Bien qu'un cobaye inoculé dans les seuls muscles de la nuque avec une rate prélevée avant la mort naturelle (observation II) ait contracté la rage, nous avons supposé que le grand nombre des résultats négatifs observés dans cette 3e série d'expériences était dû à l'absence d'injection sous-dure-mérienne, c'est-à-dire à la moins grande sévérité du mode d'inoculation. Pour contre-balancer ce facteur, nous avons, dans une dernière série de recherches (6 cobayes), inoculé dans les muscles de la nuque d'un même animal, deux et trois rates rabiques finement émulsionnées et porté à 2 et 3 jours le laps de temps pendant lequel les cadavres étaient abandonnés à la température du laboratoire avant l'ablation de l'organe. Un seul a pris la rage :

N° D'ORDRE	DATE	PROVENANCE DE LA RATE	ANIMAL INOCULÉ	MODE D'INOCULATION	RÉSULTAT
1	14 fév.	Rates enlevées 48 heures après la mort (2 rates).	Cobaye.	Muscles de la nuque.	A résisté.
2	16 fév.	Rates enlevées 2 et 3 jours après la mort (3 rates).	*Id.*	*Id.*	A résisté.
3	21 fév.	Rates enlevées 3 jours après la mort (3 rates).	*Id.*	*Id.*	Mort de rage.
4	23 fév.	Rates enlevées 2 et 3 jours après la mort (3 rates).	*Id.*	*Id.*	A résisté.
5	25 fév.	Rates enlevées 3 jours après la mort (2 rates).	*Id.*	*Id.*	A résisté.
6	26 fév.	Rates enlevées 3 jours après la mort (2 rates).	*Id.*	*Id.*	A résisté.

Obs. VIII. — Trois cobayes succombent dans la nuit du 17 au 18 février à une rage à virus de rue. On les conserve à la température du laboratoire jusqu'au 21. A cette date — soit plus de 72 heures après la mort — la putréfaction est très avancée. Les trois rates sont enlevées, émulsionnées ensemble et inoculées dans les muscles de la nuque d'un même cobaye. Le 8 mars au matin (15e jour), celui-ci présente de la tristesse, de l'inappétence, du hérissement des poils et un commencement de paralysie des muscles de la nuque. Au cours de la journée, l'état s'aggrave rapidement. Le soir, la paralysie est généralisée; la démarche de l'animal est hésitante, ébrieuse et la progression est très difficile. Il est trouvé mort le lendemain matin. Le bulbe est inoculé sous la dure-mère d'un lapin. Premiers symptômes de rage paralytique le 16 (7e jour). Mort le 18 (9e jour).

*
* *

Des faits qui précèdent, nous nous croyons en droit de conclure que le virus rabique se rencontre dans la rate beaucoup plus souvent qu'il n'est admis. Sur 42 expériences, nous avons pu déceler 8 fois sa présence. Celle-ci est tout à fait indépendante d'une généralisation du virus *post mortem*, puisque 12 cobayes prématurément sacrifiés ont fourni 3 résultats positifs. Elle doit, croyons-nous, être rattachée au fait que le virus rabique se trouve dans le sang bien plus fréquemment qu'il n'est classique. A. Marie a déjà attiré l'attention sur ce point que nous nous proposons d'aborder à nouveau. Loin de favoriser la diffusion du virus rabique dans la rate, le commencement de la putréfaction paraît, de prime abord, rendre sa constatation moins fréquente (rates d'animaux prématurément sacrifiés : 3 résultats positifs sur 12 expériences. Rates d'ani-

maux autopsiés moins de 12 heures après la mort : 3 résultats positifs sur 12 expériences. — Rates d'animaux autopsiés plus de 24 heures après la mort : 2 résultats positifs sur 18 expériences). Il n'y a là, croyons-nous, qu'une simple apparence due à l'impossibilité de recourir à l'inoculation sous-dure-mérienne, lorsque la putréfaction a commencé et à la sévérité sensiblement moindre de l'inoculation intramusculaire.

ERRATUM

Dans le travail de M. Nicolle, Mlle A. Raphael et E. Debains (*Études sur le bacille d'Eberth et les bacilles paratyphiques*), paru en juin 1918, p. 286, ligne 18, *au lieu de* : échantillon 39, *lire* : échantillon 34.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

32e ANNÉE SEPTEMBRE 1918 N° 9

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de É. Metchnikoff.

SUR LA PART QUE PREND LA CHAUX DE LA COQUILLE DE L'ŒUF DE POULE A LA FORMATION DU SQUELETTE DU POUSSIN PENDANT L'INCUBATION

par C. DELEZENNE et E. FOURNEAU.

A la suite de recherches sur le rôle du calcium dans le dédoublement de la lécithine par le venin de cobra, nous avons été amenés à effectuer des dosages de ce métal dans l'œuf de poule frais. Nous avons pu confirmer les résultats déjà obtenus par divers auteurs, à savoir : que la quantité de chaux contenue dans l'œuf est très faible et ne dépasse pas sensiblement (en CaO) 35 milligrammes, pour un œuf de 60 grammes environ. Cette constatation fournissait un argument de plus en faveur du rôle de la chaux dans le mode de dédoublement de la lécithine par le venin de cobra, et expliquait dans une certaine mesure pourquoi, dans le milieu œuf, l'hydrolyse s'arrête au terme lysocithine (1) ; mais elle suggère aussi des réflexions

(1) Voir : Delezenne et Fourneau, *Bull. Soc. Ch. France*, 4e série, t. 15, p. 421, 1914.

d'un autre ordre. En premier lieu, il paraît surprenant que le poussin, déjà si développé et si vigoureux quand il sort de sa coquille, puisse former son squelette avec une quantité aussi minime de chaux. En second lieu, si le poussin contient réellement plus de chaux que n'en renferme l'intérieur de l'œuf avant le développement, l'origine de cette chaux supplémentaire ne peut être douteuse, et la coquille concourt à la formation du squelette. Reste alors le problème le plus important : *celui du mécanisme de la mobilisation du calcium chez le poussin, mécanisme qui se répète, sans doute, d'une façon générale, dans l'utilisation des réserves calciques, chez tous les vertébrés.*

En parcourant la littérature relative au dosage du calcium dans l'œuf et dans le poussin, nous n'avons pas été médiocrement étonnés en constatant que les savants qui se sont occupés de cette question avant nous sont à peu près d'accord sur la quantité de calcium existant dans l'œuf frais, mais qu'ils diffèrent notablement d'avis, quand il s'agit du poussin. Pour les uns, le poussin contient plus de chaux que l'œuf frais; pour d'autres, il n'en contient pas davantage ; pour d'autres enfin, il en renferme plutôt moins.

Le premier qui a eu la curiosité de suivre les dosages de chaux dans l'œuf de poule, au cours de l'incubation, est le médecin anglais Prout.

Dans un travail vraiment remarquable, pour l'époque (1822) où il a été publié, Prout (1) a déterminé la quantité de quelques éléments des œufs frais et des œufs fécondés, arrivés au terme de leur développement, et noté leurs variations. Nous ne nous occuperons que des chiffres relatifs à la chaux et au phosphore qui, seuls, nous intéressent, mais il n'est pas inutile, auparavant, d'indiquer en quelques mots le procédé d'analyse du calcium employé par Prout.

Le blanc est calciné avec précaution et le charbon lessivé souvent pour faciliter la combustion; le résidu est dissous dans l'eau et neutralisé par l'ammoniaque. Le mélange, abandonné

(1) Prout, Some experimental on the change which takes place in the fixed principles of the egg during incubation, juin 1822. *Philos. trans. of the Royal Soc.*

24 heures au repos, laisse déposer le phosphate de chaux et le phosphate ammoniaco-magnésien ; on lave à l'eau et on filtre, on pèse ; du précipité, on déduit le poids de calcium, en négligeant le magnésium. Le jaune, plus difficile à brûler, est calciné avec du bicarbonate de soude et, dans le résidu, on précipite la chaux à l'état de phosphate par l'ammoniaque.

Ce procédé de dosage est certes défectueux et donne lieu à des erreurs. On comprend, dans une certaine mesure, les critiques dont le travail de Prout a été l'objet. Mais, comme le fait remarquer Prout lui-même, il s'agit seulement d'étudier des proportions, et la quantité de magnésium est si faible, qu'elle n'entre pas en ligne de compte.

Rapportés à 100 grammes d'œuf total (coquille comprise), les chiffres trouvés par Prout, pour l'œuf frais, sont les suivants :

1er *œuf* :	Albumine . . .	Phosphore.	0,045	(Ca, Mg, Carb.) . .	0,030
	Jaune	*Idem* . .	0,356	*Idem*.	0,068
			0,401		0,098
2e *œuf* :	Albumnie . . .	Phosphore.	0,046	(Ca, Mg, Carb.) . .	0,025
	Jaune	*Idem* . .	0,35	*Idem*.	0,061
			0,396		0,086
3e *œuf* :	Albumine . . .	Phosphore.	0,048	(Ca, Mg, Carb.) . .	0,030
	Jaune	*Idem* . .	0,4	*Idem*.	0,069
			0,448		0,099

Le 8e jour, les proportions de chaux et de phosphore ne sont pas sensiblement modifiées : 0,468 et 0,443 pour le phosphore ; 0,098 et 0,091 pour la chaux.

A partir du 10e jour, des modifications apparaissent. La chaux augmente constamment ; le phosphore ne change pas d'une manière sensible.

Le 10e jour, on trouve : 0,414 de phosphore et 0,105 de chaux.

Le 15e jour, on trouve : chaux, 0,114 et 0,115 ; phosphore, 0,400 et 0,393.

Le 17e jour, on trouve : chaux, 0,185 ; phosphore, 0,420.

Le 21e jour, on trouve : chaux, 0,396 et 382 ; phosphore, 0,420 et 0,407.

La chaux est donc passée de 0,098 à 0,390. Le phosphore, lui, n'a pas varié.

Comme on le verra, nos propres recherches confirment les chiffres de Prout. Mais il faut bien dire qu'au moment où parut son travail, et même plus tard, les résultats en furent accueillis avec scepticisme, sans doute à cause des considérations singulières et hasardeuses qui les accompagnaient et semblaient faire du savant anglais un représentant attardé de l'alchimie.

« Pendant la dernière semaine, dit-il, le jaune perd la plus grande partie de son phosphore, qui se trouve converti en acide phosphorique et, en union avec la chaux, constitue le squelette. Cette chaux ne préexiste pas dans l'œuf, certainement non ; en tout cas, pas sous une forme connue. Les seules sources d'où elle puisse dériver restent, par conséquent, la coquille ou quelque autre élément de l'œuf capable de former la chaux par transmutation. Si elle dérive de la coquille, cela ne peut être déterminé par la chimie. Les coquilles des œufs diffèrent tellement que l'emploi des moyennes est impossible, et nous ne pouvons, d'autre part, affirmer la quantité exacte de calcium que la coquille contient originellement.

« Il y a toutefois de fortes présomptions pour croire que la matière terreuse ne diffuse pas de la coquille. En effet, la membrane coquillière ne devient jamais vasculaire et semble analogue à l'épiderme, aussi la chaux extérieure à cette membrane est généralement considérée par les physiologistes comme extravasculaire. Il est, par suite, difficile de concevoir comment la chaux en question peut être introduite dans l'économie du poulet par cette voie, en particulier pendant la dernière période de l'incubation, alors qu'une large portion de la membrane est séparée de la coquille.

« En aucune façon, toutefois, je ne veux affirmer que la chaux ne vient pas de la coquille ; car, dans ce cas, la seule alternative qui m'est laissée est d'affirmer que cette terre est due à la transmutation de la matière, assertion qui, je le confesse, n'est pas suffisamment soutenue par les faits pour être introduite à l'heure actuelle dans le domaine de nos connaissances. Toutefois, j'incline fortement à croire que, dans certaines limites, ce pouvoir de transmutation peut être rangé parmi les possibilités de l'énergie vitale. »

Gobley (1) qui, dans son célèbre travail sur le jaune d'œuf,

(1) Gobley, *Acad. royale des Sciences*, 1846.

avait trouvé dans l'œuf près de 0,50 de chaux et de magnésie (beaucoup plus par conséquent qu'il n'y en a en réalité), n'admit naturellement pas les résultats de Prout : « La proportion de matière saline qui existe dans l'œuf frais doit être la même, dit-il, que celle qui se trouve dans les œufs couvés. L'état de combinaison de ces sels peut changer sous l'influence de l'incubation, mais je ne pense pas que la quantité puisse varier. »

Prévôt et Morin (1) ne trouvent aucune différence dans le poids de la coquille de l'œuf frais et de l'œuf couvé, et Gorupt Besanez (2), après avoir critiqué les travaux de Prout, avec des arguments un peu spécieux et en quelque manière indirects (3), estime qu'il est désirable, devant l'importance de la question, qu'elle soit reprise d'après un plan bien défini. C'est ce que Karl Voit a entrepris; nous allons voir de quelle manière (4).

Il dose d'abord la chaux dans la coquille, et il trouve qu'il n'y a aucune perte de chaux pendant l'incubation (52,46 p. 100 dans l'œuf non couvé; 52,46 p. 100 dans l'œuf couvé). Il détermine ensuite avec soin tous les éléments de l'intérieur de l'œuf frais dans lequel il trouve :

Fer	0,003207
Chaux	0,0347
Magnésie	0,008518
Acide phosphorique	0,2107

Enfin, il dose les éléments dans l'œuf couvé, en se contentant d'une seule analyse, et il trouve :

Fer	0,00241
Magnésie	0,01112
Acide phosphorique	0,02375

Quant au dosage de la chaux, le seul vraiment important, « il est malheureusement manqué, dit Voit. Pour combler cette

(1) Prévot et Morin, *Ann. des Sc. naturelles*, 4, p. 47.

(2) Gorupt Besanez, *Lehrbuch der Phys. Chem.*, p. 684, 1867.

(3) D'après les chiffres de Prout, le poussin contient moins de chlore et moins d'alcali que l'intérieur de l'œuf frais. Comme cela paraît tout à fait invraisemblable à Gorup Besanez qu'il y ait élimination de chlore et d'alcali pendant l'incubation, il en conclut que les autres dosages faits par Prout sont inexacts.

(4) Karl Voit, *Sitzber. der math.-phys. Cl. der K. B. Ak. der Wissenschaften*, 1871, t. I, p. 78.

lacune, ajoute-t-il, la chaux d'un embryon de poulet que je dois à l'obligeance de M. Bischoff a été dosée et a donné 0,0234 de chaux. »

On admettra que ce seul dosage était insuffisant (fût-il exact?) pour trancher la question. Il suffit cependant à Voit, dont l'opinion était faite à l'avance. Évidemment, il est surpris « à un haut degré » que 0,035 de chaux suffisent pour constituer le squelette du poussin; « mais, quand on y réfléchit, dit-il, il ne peut en être autrement, car beaucoup d'œufs, en particulier ceux des amphibies et des poissons, ont la même composition que ceux des poules et ne comportent pas de coquilles ».

Vaughan et Hariett Bills (1) entreprirent de nouvelles recherches et leurs analyses portèrent sur 12 œufs non couvés et 12 poussins à terme. La chaux fut évaluée à l'état de sulfate après destruction de la matière organique par la calcination, reprise par l'acide sulfurique et l'alcool, pesée à l'état de sulfate.

La moyenne pour 12 œufs non couvés est de 0,0695 de sulfate de chaux pour l'intérieur de l'œuf, correspondant à 0,0278 CaO, et 5,685 pour la coquille, correspondant à 2,274 de chaux.

La moyenne pour les 12 poussins à terme est de 0,3826 de sulfate pour le poussin (0,1530 de CaO) et 5,361 de sulfate pour la coquille (2,144 de CaO), ce qui correspond à un gain de 0,1252 pour l'intérieur de l'œuf et une perte de 0,127 pour la coquille.

Les faits paraissaient donc de nouveau en faveur de la participation de la coquille au développement de l'embryon et les recherches de Vaughan et Bills, bien que n'ayant porté que sur un assez petit nombre d'œufs, ne semblaient pas pouvoir donner lieu à des critiques sérieuses. Cependant, le célèbre biologiste Preyer (2) remit tout en question. Preyer reproche à Vaughan et Bills d'avoir employé une méthode défectueuse pour le dosage du calcium (3). Il trouve en particulier que le chiffre 0,029 donné par les auteurs américains pour l'œuf frais est si faible

(1) *Foster's Journal of Physiology*, vol. 1, 1878, p. 434.
(2) *Physiologie spéciale de l'Embryon*. Éd. française, 1897, p. 241.
(3) Cependant cette méthode de dosage à l'état de sulfate, en présence d'alcool, a été depuis très employée en Allemagne sous le nom de méthode d'Aron, et a été reconnue comme très bonne en l'absence de quantités trop fortes de sels alcalins, ce qui est le cas pour l'œuf.

qu'il ne peut pas être exact. Pour ces raisons, Preyer conclut que les évaluations faites jusque-là ne peuvent résoudre la question et il les reprend lui-même en faisant porter ses dosages sur 34 œufs, soit sur le contenu et la coque d'œufs prélevés après 1 à 2 semaines d'incubation sur le contenu et la coque de 10 œufs à terme, sur 9 œufs couvés et non développés et sur 5 œufs non couvés. Des nombres obtenus, on peut conclure avec certitude (dit Preyer) « que le poulet ne contient ni plus ni moins de chaux que le contenu de l'œuf avant son développement. La coque de l'œuf de l'oiseau ne perd aucune parcelle de chaux pendant l'incubation. »

Ces conclusions sont précédées de longues considérations qui n'ont aucune espèce d'intérêt, les chiffres de calcium trouvés par Preyer dans ses 34 œufs, et sur lesquels il s'appuie, étant si fantaisistes que la balance paraît y avoir moins de part que l'imagination.

La grande autorité qui s'attachait aux noms de Preyer et de Voit semble avoir tranché la question en leur faveur, car dans les ouvrages classiques c'est leur opinion qui est admise, quand toutefois le sujet est effleuré (ce qui est l'exception). Il faut arriver à un travail de Tangl (1) pour noter de nouvelles recherches sur la part prise par la coquille aux échanges de l'intérieur de l'œuf pendant l'incubation. Tangl, après avoir montré les points faibles de tous les travaux de ses devanciers, a voulu se placer dans des conditions expérimentales défiant les critiques. C'est ainsi qu'il n'a pris les œufs que d'une seule poule, fécondée par un seul et même coq, placée dans des conditions d'alimentation toujours les mêmes, etc.; mais, chose singulière, pour des raisons qui nous échappent, il a abordé le problème par son côté le plus difficile et le plus discutable, et il n'a fait porter ses investigations que sur la coquille, laissant l'intérieur de l'œuf de côté. Il trouve ainsi que la coquille, dont le poids moyen est de 5 gr. 76 avant le développement, ne pèse plus que 5 gr. 32 à la fin de l'incubation. Corrélativement, la quantité moyenne de chaux, qui est primitivement de 2,13 à la fin de l'incubation tombe à 1,97. Dans une autre série d'expériences, la chaux passe de 2,14 à 1,99,

(1) *Pflugers Arch.*, 121; 1908.

accusant ainsi une perte de 0,14 pour les deux séries d'expériences. Comme on le verra plus loin, il se trouve que ces chiffres correspondent à l'augmentation de poids de chaux dans l'intérieur de l'œuf quand le développement du poussin est complet, mais il nous semble que, sans la contre-partie de l'analyse du contenu de l'œuf pendant le développement, les dosages de Tangl perdent une grande partie de leur valeur. Il faut être bien sûr de ses analyses, en effet, pour affirmer qu'il y a une perte de calcium quand les différences de dosage sont en moyenne de 0,14 sur 2,13 de chaux totale; surtout quand les analyses ont porté sur 0,30 de coquille correspondant à un écart de 0,007 entre la chaux des coquilles avant et après le développement.

Si nous résumons maintenant les diverses opinions qui ont été émises sur la participation de la coquille de l'œuf au développement du squelette du poussin, nous voyons, d'un côté, Gobley, Voit, Preyer qui se refusent à l'admettre; de l'autre, Prout, Vaughan et Bills, enfin Tangl, qui, au contraire, la considèrent comme démontrée par leurs expériences.

Ces divergences de vues, encore accentuées par la notoriété de Gobley, de Voit et de Preyer, nous ont engagés à reprendre à notre tour l'étude de la question, en tâchant d'éviter les erreurs qui avaient pu être commises par nos devanciers et en nous plaçant dans des conditions telles qu'il ne puisse exister aucun doute sur les résultats obtenus.

Nous avons opéré sur un grand nombre d'œufs (65 environ) provenant pour la plupart de poules appartenant à la même race (Faverolle) et soumises aux mêmes conditions d'alimentation : leur poids moyen était de 60 grammes environ. Quelques-uns, d'origine différente (œufs n°s 53, 54 et 55) et de poids sensiblement plus faible (45 à 47 grammes), ont été joints aux précédents et maintenus en incubation jusqu'à l'éclosion sans que, dans leur ensemble, les résultats des expériences en fussent modifiés. Comme on le verra en se reportant aux chiffres des tableaux ci-après, il n'est pas indispensable, si l'on veut se borner à comparer la teneur en chaux de l'œuf frais à celle du poussin en voie d'éclosion, de choisir des œufs rigoureusement comparables. Les différences observées sont telles, en effet,

qu'elles sont à peine influencées par les variations de diverses natures que présentent les œufs à l'origine, et aucune erreur d'interprétation n'est possible. Il n'en est pas de même évidemment lorsqu'on se propose de suivre les variations de la chaux pendant toute la durée du développement; durant une assez longue période, les accroissements sont encore trop peu marqués pour être dégagés parfaitement des variations individuelles et il est indispensable de limiter le plus possible ces dernières et d'avoir recours aux moyennes pour obtenir des résultats tout à fait démonstratifs.

Pour les raisons exposées plus haut, nous n'avons fait porter aucun de nos dosages sur la coquille, tous se rapportent exclusivement au contenu de l'œuf.

Les œufs, réunis aussitôt après la ponte par séries de 20 environ, étaient pesés et portés le jour même ou le lendemain au plus tard à la couveuse artificielle. Dans chaque série, quelques-uns étaient réservés pour servir de témoins au départ et leur contenu mis aussitôt à dessécher en vue de l'analyse. Quant aux autres ils étaient prélevés successivement, d'abord le 10e et le 12e jour de l'incubation, c'est-à-dire au moment où débute l'ossification du squelette, puis régulièrement chaque jour à partir du 14e jusqu'au 21e jour, moment de l'éclosion.

La plupart des œufs se sont développés normalement et ceux qui ont été maintenus dans la couveuse jusqu'au 21e jour nous ont toujours donné des poussins très vigoureux.

A titre de contrôle nous avons également dosé la chaux dans des œufs non fécondés qui avaient été maintenus à la couveuse avec les précédents pendant 14 et 21 jours et aussi dans quelques autres qui avaient été simplement conservés après la ponte pendant une assez longue période à la température ordinaire.

D'autre part, comme il n'était pas sans intérêt de vérifier les résultats obtenus avec les œufs de poule, en s'adressant aux œufs d'autres oiseaux, nous avons étendu nos recherches aux œufs de cane et aux œufs de paon, en nous bornant toutefois, pour ces derniers, à doser comparativement la chaux dans l'œuf frais et dans l'embryon à la fin de l'incubation.

Comme on le verra en détail plus loin, les résultats de ces recherches sont des plus nets : au moment de sortir de

la coquille le poussin contient 5 à 6 fois plus de chaux que n'en contenait l'intérieur de l'œuf frais. Dans l'œuf de poule, l'augmentation de la chaux commence à apparaître vers le 10e jour, c'est-à-dire sensiblement à l'époque où débute l'ossification du squelette; elle s'accuse fortement du 16e au 17e jour et se poursuit alors régulièrement jusqu'à l'éclosion. Dans le poussin à terme, le squelette, complètement débarrassé des muscles, contient déjà à lui seul au moins 3 fois plus de chaux que n'en renfermait primitivement l'œuf frais tout entier.

Le procédé que nous avons employé pour le dosage du calcium n'a rien de spécial, mais il y a quelques précautions à prendre pour la destruction des matières organiques comme pour la précipitation de l'oxalate de calcium, et nous ne croyons pas inutile de décrire avec soin la méthode que nous avons suivie.

Si on désire seulement doser le calcium, on peut calciner l'intérieur de l'œuf dans une capsule en platine. La calcination de l'œuf frais et celle de l'œuf ayant atteint son plein développement indiquent déjà la différence considérable qui existe dans la nature des cendres et aurait dû frapper, semble-t-il, tous ceux qui se sont occupés de la question. Tandis que la calcination de l'œuf frais est très difficile à conduire jusqu'à la destruction totale des matières organiques et laisse un verre transparent, fusible, *très acide* et presque entièrement soluble dans l'eau, la calcination du poussin est relativement aisée et, quand elle est terminée, on se trouve en présence d'un squelette parfaitement formé et complet, montrant dans toute sa délicatesse et ses moindres détails la charpente osseuse du poussin.

Les cendres sont reprises par de l'eau acidulée de quelques gouttes d'acide chlorhydrique et la solution est versée dans un vase à précipité de 250 cent. cubes. La capsule est lavée plusieurs fois avec de l'eau distillée. La solution, qui doit occuper le volume de 100 cent. cubes environ, est rendue légèrement alcaline par de l'ammoniaque en présence de nitrophénol ou de pérézol, puis acidifiée par 3 gouttes d'acide acétique. S'il y a un précipité (phosphate de fer), on le filtre, puis on ajoute 10 cent. cubes d'une solution saturée d'oxalate d'ammoniaque; on agite et on attend 24 heures sans chauffer; on termine le dosage comme d'habitude en pesant d'abord à l'état de chaux, puis en

transformant la chaux en sulfate en présence de quelques cristaux de nitrate d'ammoniaque (1).

La destruction de la matière organique par la calcination occasionne une perte notable de phosphore; aussi, comme dans beaucoup de cas nous désirions doser également ce métalloïde, nous avons détruit l'œuf par le mélange sulfonitrique, d'après la méthode de Neumann.

Le contenu de l'œuf, séché à 100°, est pulvérisé et la poudre est de nouveau séchée à 100°. On en prend 1 à 2 grammes qu'on introduit dans un ballon de Kjeldahl avec 30 cent. cubes d'acide nitrique. On chauffe pour chasser la majeure partie de l'acide nitrique; puis on ajoute après refroidissement 10 cent. cubes d'acide sulfurique. On chauffe de nouveau, puis on ajoute 10 cent. cubes d'acide nitrique, et on chauffe jusqu'à l'obtention d'une liqueur claire. On reprend par 100 cent. cubes d'eau et 30 cent. cubes de nitrate d'ammoniaque à 80 p. 100; on porte à l'ébullition et on ajoute à chaud 80 à 100 cent. cubes de solution de molybdate d'ammoniaque à 3 p. 100 dans un mélange à parties égales d'eau et d'acide nitrique à 1,2. L'ébullition étant maintenue pendant quelques minutes, le précipité se dépose intégralement; on décante sur un filtre et on lave le précipité avec de l'acide nitrique étendu, puis avec de l'alcool. Le filtre est jeté dans un ballon de Kjeldahl de 500 cent. cubes; le molybdate est dissous dans de la soude demi-normale, la solution est portée à l'ébullition jusqu'à ce que l'ammoniaque ait été chassée. On titre enfin la soude en excès par de l'acide sulfurique demi-normal.

La formule $\frac{1,268 \times D \times 10}{S}$ donne le poids de P^2O^5; $D =$ la différence entre la soude ajoutée et la soude retrouvée; $S =$ la substance.

Si au lieu de doser le phosphore par titrage acidimétrique, on veut le doser par pesée, on filtre le phosphomolybdate dans un creuset de Gooch; on lave à l'acide nitrique et on sèche à 160° exactement. Le précipité contient alors $PO^4(NH^4)^3$, $12\ MoO^3$ (3,782 p. 100 P^2O^5).

(1) On peut ajouter 0 gr. 50 d'acide citrique et précipiter l'oxalate à chaud en liqueur légèrement ammoniacale.

Les résultats des analyses sont donnés dans les tableaux suivants, qui indiquent :

1° Le poids de l'œuf frais;
2° La chaux du contenu de l'œuf au jour du prélèvement;
3° La chaux rapportée à 100 gr. d'œuf entier pesé au moment de la ponte;
4° Le phosphore total p. 100 pour l'œuf entier.

Œufs de poule à divers stades d'incubation.

NUMÉRO de L'ŒUF	JOUR du PRÉLÈVEMENT	POIDS DE L'ŒUF après LA PONTE	CaO par ŒUF	CaO pour 100 gr. D'ŒUF pesé après LA PONTE	PHOSPHORE p. 100 P^2O^5
1	1er jour.	64,45	0,0340	0,0540	
2	—	62,30	0,0369	0,0582	
3	—	62,10	0,0384	0,0607	
4	—	61,25	0,0381	0,0605	
5	—	58,35	0,0378	0,0722	
6	—	56,85	0,0371	0,0650	0,491
7	—	56,84	0,0365	0,0642	
8	—	53,04	0,0348	0,0650	0,469
	Moyenne :	**59,39**	**0,0366**	**0,0624**	
11	10e jour.	60,65	0,0375	0,068	
12	—	59,47	0,0407	0,0618	0,485
13	—	59,08	0,0395	0,0657	
14	—	58,39	0,0377	0,0643	
15	—	57,88	0,0408	0,0704	
16	—	50,35	0,0379	0,0743	
	Moyenne :	**57,62**	**0,0390**	**0,0664**	
21	12e jour.	59,13	0,0468	0,0791	
22	—	53,84	0,0413	0,0767	
23	—	57,75	0,0439	0,0760	
24	—	59,61	0,0389	0,0653	
	Moyenne :	**57,60**	**0,0427**	**0,0742**	
25	14e jour.	56,61	0,0480	0,0849	
26	—	53,16	0,0575	0,1080	
27	—	58,98	0,0500	0,0848	
28	—	59,37	0,0592	0,0997	
	Moyenne :	**57,03**	**0,0536**	**0,0943**	

Œufs de poule à divers stades d'incubation (*suite*).

NUMÉRO de L'ŒUF	JOUR du PRÉLÈVEMENT	POIDS DE L'ŒUF après LA PONTE	CaO par ŒUF	CaO pour 100 gr. D'ŒUF pesé après LA PONTE	PHOSPHORE p. 100 P^2O^5
30	15e jour.	63,68	0,0650	0,1030	0,431
31	—	63,72	0,0658	0,1013	
	Moyenne :	**63,70**	**0,0654**	**0,1021**	
32	16e jour.	58,72	0,0675	0,1149	0,460
33	—	60,77	0,0741	0,1220	0,467
34	—	56,95	0,0672	0,1180	
35	—	57,81	0,0620	0,1072	
	Moyenne :	**58,56**	**0,0677**	**0,1155**	
36	17e jour.	60,16	0,1126	0,1873	0,521
37	—	55,09	0,1060	0,1930	
	Moyenne :	**57,12**	**0,1093**	**0,1901**	
38	18e jour.	61,33	0,1552	0,2530	0,485
39	—	62,10	0,1354	0,2180	
40	—	56,68	0,1040	0,1833	
41	—	58,60	0,1243	0,2190	
	Moyenne :	**59,70**	**0,1297**	**0,2183**	
42	19e jour.	63,16	0,1630	0,2580	0,482
43	—	64,84	0,1800	0,2776	
44	—	62,10	0,1713	0,2760	
	Moyenne :	**63,30**	**0,1717**	**0,2705**	
45	20e jour.	58,06	0,2062	0,3550	0,400
46	—	52,93	0,1612	0,3050	
47	—	67,90	0,2006	0,2954	
48	—	60,27	0,1774	0,2943	
49	—	55,48	0,1550	0,2800	
	Moyenne :	**58,90**	**0,1802**	**0,3053**	
50	21e jour.	56,24			0,397
51	—	64,32	0,2374	0,3690	
52	—	54,60	0,2050	0,3755	
53	—	47,55	0,1510	0,3180	
54	—	46,30	0,1482	0,3200	
55	—	45,53	0,1403	0,3082	
	Moyenne :	**52,42**	**0,1760**	**0,3400**	

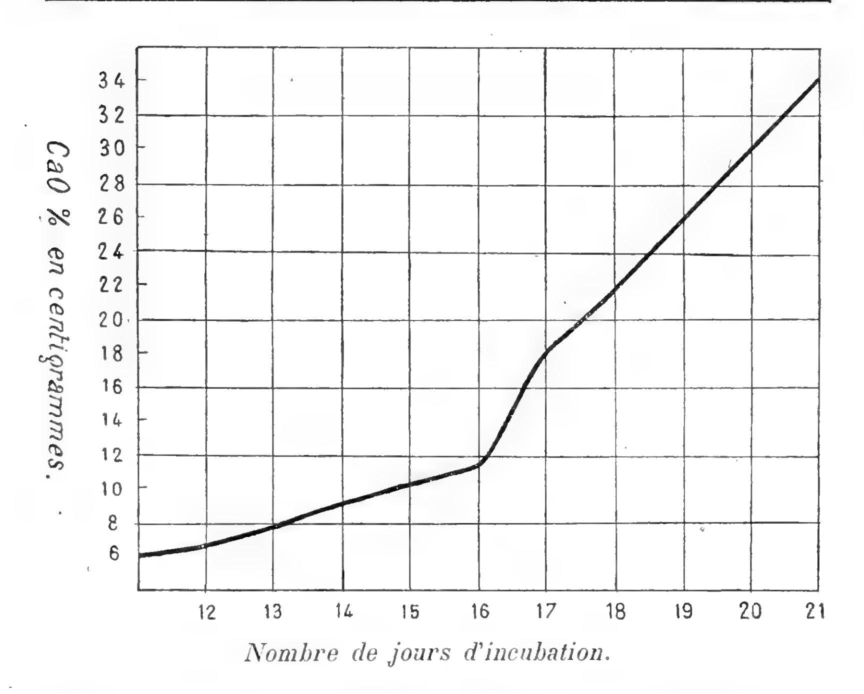
NUMÉRO de L'ŒUF	JOUR du PRÉLÈVEMENT	POIDS DE L'ŒUF après LA PONTE	CaO par ŒUF	CaO pour 100 gr. D'ŒUF pesé après LA PONTE	PHOSPHORE p. 100 P^2O^3
Œufs de poule non fécondés maintenus à la couveuse.					
18	14e jour.	57,64	0,0318	0,0552	
19	21e jour.	56,60	0,0335	0,0598	
Œufs de poule abandonnés 34 jours à la température ordinaire.					
17	»	59,74	0,0416	0,0694	
20	»	60,62	0,0362	0,0601	

NUMÉRO de L'ŒUF	JOUR du PRÉLÈVEMENT	POIDS DE L'ŒUF après LA PONTE	CaO par ŒUF	CaO pour 100 gr. D'ŒUF pesé après LA PONTE	PHOSPHORE p. 100 P^2O^5
Œufs de paon.					
56	1er jour.	108,84	0,1060	0,0974	
57	—	112,90	0,1075	0,0954	0,478
	Moyenne :	**110,87**	**0,1065**	**0,0964**	
58	28e jour.	107,16	0,5095	0,4689	0,418
59	—	108,40	0,4778	0,4405	
	Moyenne :	**110,8**	**0,4936**	**0,4547**	
Œufs de cane.					
60	1er jour.	96,21	0,0820	0,0852	
61	—	94,00	0,0813	0,0867	
62	—	82,40	0,0829	0,1007	
	Moyenne :	**90,87**	**0,0818**	**0,0908**	
63	28e jour.	91,90	0,2890	0,3143	
64	—	82,19	0,3392	0,4130	
65	—	97,40	0,3070	0,3150	
	Moyenne :	**90,50**	**0,3117**	**0,3473**	

Moyennes des teneurs en chaux

pour toute la durée du développement de l'œuf de poule.

JOURS	POIDS DES ŒUFS	CHAUX PAR ŒUF	CHAUX POUR CENT
1	59,39	0,0354	0,0624
10	57,62	0,0390	0,0674
12	57,6	0,0427	0,0742
14	57	0,0536	0,0943
15	63,7	0,0654	0,1021
16	58,56	0,0677	0,1155
17	57,12	0,1093	0,1901
18	59,7	0,1297	0,2183
19	63,3	0,1717	0,2705
20	58,90	0,1802	0,3053
21	52,42	0,1760	0,3400



Graphique représentant l'augmentation progressive de la chaux dans l'œuf de poule au cours de l'incubation.

*
* *

En *résumé*, si nous nous en tenons pour le moment aux seuls éléments qui nous intéressent, nous pouvons mettre en évidence les constatations suivantes :

1° Le poids moyen de la chaux (CaO) contenue dans l'œuf de poule frais (de 60 grammes environ) est de 0,0354; il est déjà de 0,067 au 16e jour de l'incubation, de 0,129 au 18e, de 0,180 au 20e et atteint ou dépasse même 0,200 au 21e jour, c'est-à-dire au moment de l'éclosion (œufs nos 51 et 52). Des œufs ne pesant à l'origine que 45 à 47 grammes (nos 53, 54 et 55) renferment eux-mêmes; à la fin de l'incubation, au moins 4 fois plus de chaux que des témoins non incubés dont le poids est voisin de 60 grammes.

2° Le poids moyen p. 100 de la chaux, qui est de 0,0624 pour l'œuf frais, est de 0,340 pour le poussin au moment de l'éclosion, le pourcentage étant calculé sur l'œuf entier pesé au moment où il est mis à couver.

L'augmentation de la teneur en chaux du contenu de l'œuf, pour toute la durée de l'incubation, est donc d'environ 500 p. 100.

Cette augmentation, qui commence à se traduire, dans les dosages, du 10e au 12e jour d'incubation, reste relativement peu marquée jusqu'au 16e jour, à partir duquel (voir la courbe ci-jointe) les accroissements s'accentuent fortement pour se poursuivre d'une façon très régulière jusqu'à l'éclosion.

3° Dans l'œuf de poule non fécondé et mis à couver, le poids de chaux p. 100 après 21 jours est exactement le même que dans l'œuf frais. Aucune trace de chaux n'est passée de la coquille dans l'intérieur de l'œuf.

4° Dans les œufs de paon, dont l'incubation dure 25 jours, le poids de chaux passe de 0,1065 à 0,4936; le poids de chaux p. 100 passe de 0,0964 à 0,4547.

5° Dans les œufs de cane dont l'incubation dure 28 jours, le poids de chaux s'élève de 0,0818 à 0,311 et le poids de chaux p. 100 de 0,0908 à 0,347. L'augmentation n'est pas tout à fait de 400 pour 100.

L'œuf de cane contient donc plus de chaux que l'œuf de poule pour 100, mais le caneton ne contient pas plus de chaux

que le poussin, malgré que le développement ait duré 7 jours de plus.

6° Le phosphore n'augmente pas au cours de l'incubation (1).

Il est donc bien démontré par nos expériences que le poussin emprunte à la coquille la plus grande partie de la chaux nécessaire à son développement et à la formation de son squelette.

Envisagée au point de vue de son rôle physiologique, la coquille de l'œuf des oiseaux constitue donc, pour l'embryon, une véritable *réserve calcique* que celui-ci utilise, au cours de l'incubation, en mettant en jeu des mécanismes qu'il reste encore à déterminer.

Quelle que soit la complexité de ces mécanismes, on peut d'ores et déjà affirmer que les modifications profondes subies par le vitellus et l'albumine pendant le développement se font suivant un rythme régulier au cours duquel une substance est libérée en quantité déterminée et définie, substance qui a la propriété de dissoudre une quantité également déterminée de la chaux de la coquille.

Cette substance est-elle l'acide carbonique? est-ce un autre acide organique ou minéral? est-ce un sucre? est-ce l'allantoïne? Nous n'en savons rien.

Il semble toutefois que la réponse doive être cherchée dans une analyse minutieuse du liquide amniotique qui, au moment où la dissolution de la chaux paraît prendre une ampleur particulière (vers le 17e jour), vient presque seul au contact de la coquille à travers la membrane coquillière.

Nous nous proposons de poursuivre ces recherches et de pénétrer plus profondément dans l'étude de ce problème très important de la chimie de l'embryon (2).

(1) En se référant aux chiffres des tableaux, on serait même tenté de conclure que le phosphore diminue dans l'œuf, à la fin de l'incubation. Nos analyses sont trop nombreuses pour affirmer qu'il en est bien ainsi ; de nouvelles recherches systématiques sont nécessaires pour trancher définitivement cette question.

(2) Au cours de longs et minutieux dosages que nous avons eu à effectuer, nous avons été habilement secondés par Mme Ramart-Lucas. Nous lui exprimons nos plus sincères remerciements.

RECHERCHES
SUR LA TRANSMISSION DU PALUDISME
PAR LES
ANOPHÈLES FRANÇAIS DE RÉGIONS NON PALUSTRES
(YONNE ET RÉGION PARISIENNE)

par E. ROUBAUD.

I

GÉNÉRALITÉS

I. — Les Anophèles français des régions non palustres sont-ils aptes à propager l'infection?

L'existence des Anophèles dans toute la région parisienne est un fait bien connu. Les larves de l'*A. maculipennis* se recueillent dans la plupart des collections d'eau de la banlieue de Paris, et leur existence aux portes de la capitale dans des stations diverses, à Meudon, à Garches, à Saint-Cloud, dans le bois de Boulogne, a été précisée notamment par Ed. et Ét. Sergent (1). Dans la ville même, la rencontre de ces moustiques n'est pas impossible. S'il est peu probable que les larves fréquentent encore les fontaines publiques, comme au temps de Joblot (1754) qui les découvrit au Faubourg Saint-Jacques, des moustiques adultes, provenant sans doute de l'extérieur, ont pu être capturés dans l'intérieur de Paris par quelques observateurs : par Guiart (2), dans une rue de Passy, par Grandidier et Neveu-Lemaire (3), au Muséum, par moi-même

(1) *Annales de l'Institut Pasteur,* t. XVI, décembre 1902, p. 940.

(2) *Précis de Parasit.*, 1910 et : Les Parasites inoculateurs de maladies, *Bibl. Philos. scient.* Paris, 1911, p. 48.

(3) *Bull. Mus. Hist. nat.*, t. XIV, 1908, p. 39.

enfin (1), tout récemment, dans un des laboratoires de l'Institut Pasteur.

Ce sont là d'ailleurs captures purement fortuites, exceptionnelles, et offrant surtout un intérêt de curiosité ; mais elles n'en révèlent pas moins l'existence latente, à proximité immédiate de nos murs, du moustique vecteur de l'affection palustre.

Malgré l'abondance relative des Anophèles, l'endémie palustre ne paraît pas avoir jamais envahi la région parisienne, qui constitue, à ce point de vue, un exemple très net de ce que l'on a appelé « l'Anophélisme sans paludisme » (paludisme sans malaria des auteurs italiens). On sait qu'un grand nombre de régions françaises, dans notre pays peu éprouvé par le paludisme, sont dans le même cas : ainsi l'Isère d'après Léger, la vallée de l'Essonne d'après Ét. Sergent, le Lyonnais selon R. Blanchard, Conte et Vaney, etc.; sans doute pourrait-on dire aussi toutes les régions de France où le paludisme n'a pas été observé.

L'existence en grand nombre des Anophèles, en dehors de toute épidémie palustre, s'observe d'ailleurs assez largement en Europe comme l'ont montré Nuttall, L. Cobbett et Strangeways-Pigg en Angleterre, Galli-Valerio dans le canton de Vaud, Schoo en Hollande, Celli en Italie, etc. ; mais les causes réelles de cette discordance dans la répartition géographique des hôtes et des parasites ne sont pas connues.

On pourrait chercher l'explication de ce fait dans la non-introduction du virus. Mais, en France tout au moins, il semble difficile de soutenir qu'à aucun moment les germes de l'infection n'ont pu être apportés, au contact des Anophèles existants, par des paludéens d'origine coloniale ou autre.

Une autre hypothèse a pu être envisagée avec plus de vraisemblance. Certains auteurs, Grassi, Schaudinn, A. Celli, etc., ont admis l'existence de races d'Anophèles réfractaires à l'infection palustre. L'inaptitude de ces races de moustiques à s'infecter en suçant du sang de paludéens expliquerait aisément l'absence de paludisme dans des régions à Anophèles. On a même pu fonder espoir sur la diffusion artificielle de telles

(1) *Bull. Soc. Path. exot.*, t. IX, 1916, p. 203.

races, dans les régions palustres, en vue d'une action prophylactique.

Pour A. Celli (1) non seulement les Anophèles de région non palustre ne s'infecteraient qu'en proportion très faible, au contact de paludéens, mais ces moustiques auraient même perdu l'habitude de sucer le sang de l'homme. Ce sont là données séduisantes mais qui demanderaient confirmation. On ne peut encore les envisager que comme hypothèses dont la valeur réelle reste à établir.

Les circonstances actuelles, en ramenant sur notre sol une quantité exceptionnelle de paludéens : coloniaux, troupes exotiques, troupes d'Orient, etc., ont donné à la question une nouvelle et plus pressante actualité.

Il était nécessaire dès lors de préciser les possibilités réelles d'infection et de transmission des Anophèles français dans les régions non palustres, afin d'être fixé sur les craintes permises d'extension du paludisme sur notre sol, et d'apprécier une fois pour toutes le véritable fondement des hypothèses relatives à l'immunité de nos races d'Anophèles.

II. — Démonstration de l'absence d'immunité palustre chez les Anophèles des régions non palustres.

Aucun essai d'infestation expérimentale des Anophèles et de transmission du paludisme par nos races autochtones n'a encore été tenté en France. J'ai cherché à profiter des circonstances exceptionnelles créées par la guerre pour résoudre les principales questions encore en suspens sur ce sujet.

L'organisation, à l'Institut Pasteur, par M. Marchoux, d'un Dispensaire antipaludique dépendant du gouvernement militaire de Paris, m'a permis de trouver sur place les porteurs de virus nécessaires à ces recherches (2). Il était facile d'autre part de recueillir aux environs de Paris des larves d'Anophèles en abondance. J'ai organisé au laboratoire les élevages nécessaires durant l'été dernier.

(1) *Att. d. Soc. Stud. d. Mal.*, t. III, 1902, p. 115.

(2) J'adresse ici tous mes remerciements à M. Marchoux, ainsi qu'à M. le médecin-major Vaillant, directeur du Dispensaire, qui ont bien voulu me faciliter ces recherches.

Méthodes d'étude. — Les larves d'Anophèles qui ont été utilisées pour ces expériences ont été recueillies, les unes dans la pièce d'eau des Suisses à Versailles, les autres dans les étangs de Meudon (étang de Villebon), d'autres enfin dans la région de l'Yonne, à Villebrevin. Les larves, conservées dans de larges cristallisoirs, sur une nappe d'eau de 1 centimètre d'épaisseur à peine, étaient nourries de poussière d'algues vertes (*Protococcus viridis*) en suspension fine dans l'eau des récipients. J'ai pu, par ce procédé, réaliser assez facilement l'élevage complet des larves de petite taille, toujours difficile à obtenir. Je n'ai opéré qu'avec l'*A. maculipennis*.

Pour l'élevage des moustiques adultes et la pratique des expériences d'infection et de transmission je me suis servi du petit modèle de cages de mousseline qui m'a rendu de grands services pour l'éducation des mouches tsétsés, et dont j'ai précédemment donné la description (1).

Ces cages étaient placées à l'intérieur d'un cristallisoir recouvert d'un couvercle de verre. Il est facile de réaliser une atmosphère saturée d'humidité à l'aide d'un récipient d'eau disposé à côté de la cage. Mais j'ai pu reconnaître que la saturation hygrométrique de l'air n'est nullement indispensable à la vie des Anophèles adultes. Ces moustiques s'élèvent fort bien pendant un temps prolongé à l'humidité normale du laboratoire (60-70 p. 100, pour une température moyenne de 18-20° C.).

A l'étuve à 25° C., il est préférable de maintenir les moustiques en air saturé. Un degré hygrométrique de 50 à 60 p. 100 est insuffisant pour un élevage durable.

Les moustiques étaient abreuvés dans les cages à l'aide d'une petite éponge imbibée d'eau. Cette précaution est indispensable, car les Anophèles boivent fréquemment, même s'ils ont la possibilité d'une alimentation sanguine.

A. — Expériences démontrant la réceptivité des Anophèles du bassin parisien aux deux formes de la tierce.

La première question qui se posait était la suivante : les Anophèles d'une région non palustre comme l'Yonne ou la région

(1) *Bull. Soc. Path. exot.*, t. X, n° 7, 11 juillet 1917, p. 631.

parisienne sont-ils réellement aptes, ou non, à subvenir au développement de la génération sexuée des *Plasmodium* humains?

Pour résoudre cette question, j'ai fait piquer des lots divers d'*Anopheles maculipennis*, éclos au laboratoire, sur des paludéens provenant pour la plupart de l'armée d'Orient, venus pour examens ou traitement à l'Institut Pasteur et qui se sont bénévolement offerts à ces piqûres. Les deux formes dominantes, pour ne pas dire exclusives, du paludisme en Macédoine sont le *P. vivax*, agent de la tierce bénigne, et le *Pl. præcox* (*Pl. falciparum*) de la tierre maligne. J'ai expérimenté sur ces deux formes, soit en infections pures, chez des malades soumis à des examens répétés souvent depuis plusieurs mois, soit en infections mixtes. La quarte étant exceptionnelle chez les malades que j'ai pu avoir à ma disposition je n'ai pas expérimenté sur cette forme. J'ai fait varier autant que possible les conditions de température et d'humidité auxquelles étaient soumis les moustiques de mes expériences de façon à apprécier l'influence de ces conditions sur l'infection.

Le détail des différentes expériences que j'ai réalisées est exposé ci-après.

I. — Expériences relatives au *Plasmodium vivax*.

Exp. I. — Quatre Anophèles, originaires de Versailles, nés le 7 août, piquent le 13 août le soldat P... (nombreux schizontes de 24 heures et gamètes non rares). Trois jours plus tard, le 16 août, nouveau repas sur V... (schizontes et gamètes nombreux). Les moustiques sont placés depuis leur naissance, pendant toute la durée de l'expérience, à l'étuve à 25° C. en air humide.

Examen d'un premier moustique le 19 août (6 jours après le début de l'expérience) : 6 oocystes sont visibles sur la paroi de l'estomac. Le deuxième moustique sacrifié et examiné le 24 (11e jour) montre encore un sporocyste sur la paroi stomacale, et déjà des sporozoïtes, en petit nombre dans les glandes salivaires. Le troisième moustique, sacrifié le 28 (15e jour) présente uniquement des sporozoïtes salivaires. C'est ce moustique qui a pris part à l'expérience d'auto-inoculation relatée plus loin.

Le quatrième Anophèle, mort le 26, n'a pu être examiné en temps utile.

Résultat. — Sur *trois* Anophèles mis en expérience et examinés, *trois infectés.*

Exp. II. — Quatorze Anophèles, originaires de l'étang de Villebon (Meudon), sont répartis par lot de sept en deux cages, la cage A conservée à l'étuve à 25-28° C. en air non saturé d'humidité, la cage B, conservée à la température du laboratoire (températures extrêmes observées pendant la durée de l'expérience, min. 17°, max. 26° C.; moyenne 18-20° C.).

Du 23 au 28 août, quatre paludéens, les soldats A... (schizontes nombreux, gamètes non décelés), R... M... (schizontes et gamètes rares), C... (gamètes très rares) et L... (gamètes non rares), sont piqués par les moustiques des deux cages. Ceux de la cage A *seuls*, sont portés en outre le 27 août sur le soldat X... (gamètes nombreux). Trois des moustiques seulement consentent à se nourrir.

L'expérience n'a donné de résultats positifs que pour les moustiques de la cage A ayant piqué le malade X... Aucun des moustiques de la cage B, examinés à des temps variables, n'a été reconnu infecté.

Pour la cage A, sur sept moustiques, *trois* ont été reconnus infectés. Les deux premiers moustiques, examinés les 31 août et 1er septembre, n'ont pas montré d'infection. Le troisième, examiné le 2 septembre, montre une dizaine de sporocystes, sans sporoblastes encore visibles. Le quatrième moustique, sacrifié le 8 septembre, montre des sporozoïtes en petit nombre dans les glandes salivaires. Le cinquième, examiné le 11 septembre, montre des sporozoïtes assez nombreux.

Résultat. — Sur *quatorze* Anophèles mis en expérience, *trois* infectés.

Dans cette expérience, il est bien manifeste que seul le malade X... a été susceptible d'infecter les moustiques. Trois sur cinq des Anophèles de la cage A se sont gorgés de sang sur ce malade, trois sur cinq d'entre eux ont été également reconnus infectés.

Exp. III. — Le 6 septembre, *trois* Anophèles, originaires de Meudon, sont mis à piquer sur le soldat G... (rares gamètes ♂ ♀; les ♂ prédominants : environ 1, p. 200 leucocytes). Deux des moustiques sont maintenus à la température du laboratoire (moyenne 18-20° C.; min. absolu 15° C., max. absolu 24° C.) en air saturé d'humidité. Le troisième moustique est mis à l'étuve (25-28° C.) en air non saturé.

Les trois Anophèles sont tués et examinés le 17 septembre (11e jour).

Le moustique de l'étuve ne montre pas d'infection. Les deux autres moustiques montrent chacun une infection très faible : chez chacun d'eux, un seul sporocyste est visible sur la paroi de l'estomac, les glandes salivaires ne sont pas encore infectées.

Résultat. — Sur *trois* Anophèles mis en expérience, *deux* infectés.

Exp. IV. — Le 7 septembre, *un* Anophèle, originaire de Villebrevin (Yonne), pique le soldat L... (gamètes ♂ et ♀ non rares, environ 3, p. 100 leucocytes). Le moustique est gardé à la température et à l'humidité normales du laboratoire (même moyenne thermique que ci-dessus). Examen le 22 septembre (15e jour). Le moustique montre une infection intense : 17 sporocystes presque à l'état de maturité renfermant des sporoblastes et des sporozoïtes. On n'observe pas encore d'infection salivaire.

Résultat. — L'unique exemplaire mis en expérience est infecté.

Exp. V. — Le 19 septembre, deux Anophèles, originaires de Meudon, piquent le malade S... (gamètes ♂ ♀ non rares, environ 3, par 100 leucocytes). Les moustiques sont gardés à la température du laboratoire. Examen du premier moustique le 5e jour, du deuxième moustique le 30e jour. Aucune infection.

Résultat négatif.

II. — Expériences relatives au *Pl. præcox.*

Exp. I. — Dix Anophèles, originaires de Meudon, piquent le 30 août l'adjudant B... (croissants assez nombreux). Ils sont ensuite répartis en deux lots de cinq, l'un placé à l'étuve de 25° C. à l'humidité normale de l'air (cage A), l'autre (cage B) à la température et à l'humidité normales du laboratoire.

Trois des moustiques de la cage A meurent sans pouvoir être examinés. Les deux moustiques restants sont examinés l'un le 9e jour, l'autre le 12e jour. Ils montrent tous deux une infection sporocystique intense, les sporozoïtes n'étant pas encore mûrs.

Deux des moustiques de la cage B meurent sans pouvoir être examinés. Le troisième moustique, examiné le 6 septembre (7e jour), montre de jeunes sporocystes. Les deux autres, examinés l'un le 25e jour, l'autre le 127e jour, montrent des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires.

Résultat. — Sur *cinq* moustiques examinés, *cinq* reconnus infectés.

Exp. II. — Quatre moustiques, originaires de Meudon, piquent le 3 septembre le soldat Ag... (croissants assez nombreux). Deux des moustiques sont ensuite placés à l'étuve à 25° C. en air humide saturé, les deux autres maintenus à la température du laboratoire en air saturé d'humidité. (Température moyenne, 18-20° C.; max. absolu, 24°, min. absolu 15°.) Des deux moustiques placés à l'étuve, l'un est examiné le 10 septembre (7e jour) et reconnu porteur de nombreux sporocystes, l'autre est examiné le 17 septembre (14e jour) et montre une infection intense des glandes salivaires et de la cavité générale par des sporozoïtes mûrs, avec des sporocystes encore normaux sur la paroi stomacale.

Des deux moustiques conservés à la température du laboratoire, l'un meurt sans examen possible après 48 heures, le deuxième, examiné le 21e jour, montre une infection salivaire achevée.

Résultat. — Sur *trois* moustiques examinés, *trois* reconnus infectés.

Exp. III. — Le soldat L... (croissants ♀ assez nombreux, ♂ non visibles) est piqué le 4 septembre par cinq Anophèles originaires de Meudon et de la région de l'Yonne (Villebrevin); trois des moustiques sont placés à l'étuve à 25° C. en air humide saturé, des deux autres à l'étuve à 25° C. en air non saturé.

Résultat. — Sur cinq moustiques tués et examinés à des temps divers, aucune infection.

Exp. IV. — Un Anophèle, originaire de Meudon, pique le 18 octobre le malade X... (croissants nombreux ♂ ♀). Le moustique est maintenu à la température du laboratoire (les 2 premiers jours, moyenne de 11° C. environ : min., 7°5, max., 14°5; les jours suivants, moyenne de 17° C. : min., 14°, max. 20° C.). Examen le 2 novembre. Le moustique est envahi par des levures. Aucun développement sporocystique n'est visible.

Exp. V. — Un Anophèle, originaire de Meudon, pique le 10 novembre le soldat D... (croissants assez nombreux). Le moustique est maintenu à la température du laboratoire (min., 12°, max., 18° C., moyenne, 14°75 C.). Le moustique meurt le 27, envahi par des champignons et des levures. Aucun développement sporocystique n'est visible.

Nota. — Ces deux dernières expériences ont été réalisées dans des conditions de température défavorables, qui n'auraient pas permis le développement des *Plasmodium*.

III. — Expériences sur des cas d'infection mixte.

Exp. I. — Six Anophèles originaires de Meudon, répartis en 2 lots de trois, piquent le 1er septembre le soldat T... (infection mixte : rosaces de *Pl. vivax*, croissants ♂ et ♀ de *Pl. præcox* assez rares), à une température de 18° C. Ils sont ensuite placés à 25° C., les uns en air saturé d'humidité, les autres en air normal.

Examinés du 6e au 10e jour, aucun des moustiques n'est infecté.

Résultat négatif.

Exp. II. — Deux Anophèles originaires de Meudon, piquent le 10 septembre le soldat S... (infection mixte : schizontes de *Pl. vivax*, croissant non rares ♂ et ♀ de *Pl. præcox*). Ils sont ensuite conservés à la température de laboratoire (moyenne, 17-19°).

L'un des deux moustiques meurt sans pouvoir être examiné ; l'autre moustique, examiné le 7e jour, ne montre pas d'infection.

Résultat négatif.

Ces expériences démontrent nettement la possibilité, pour les *Anopheles maculipennis* de la région parisienne et de l'Yonne, de s'infecter et de subvenir au développement sexué complet des deux types de *Plasmodium* de la tierce, le *vivax* et le *præcox*. En reprenant le total des expériences on voit que, pour le *Pl. vivax*, sur *cinq* essais différents qui ont été effectués, *quatre* ont donné des résultats positifs d'infection des Anophèles. Pour le *Pl. præcox*, sur *cinq* expériences réalisées, dont

trois seulement à température favorable, *deux* ont donné des résultats d'infection, avec le plus souvent parasitisme intense. Par contre, sur les deux essais tentés avec des cas d'infection mixte, aucun n'a donné de résultats.

Nous discuterons plus loin les conditions de ces infestations et leurs caractéristiques d'intensité, de durée, etc. Mais, dès à présent, nous pouvons dire que, lorsque ces conditions sont réalisées, les Anophèles français provenant d'une région non-palustre s'infectent en quelque sorte *à coup sûr* et que l'évolution de leur parasitisme est absolument typique. Dans la plupart des expériences ayant donné des résultats positifs, *tous* les Anophèles examinés ont été reconnus infectés. La proportion serait alors de 100 p. 100.

En tenant compte des expériences à résultats négatifs, l'ensemble des expériences fournit pour *Pl. vivax* le chiffre de 9 infections sur 23 Anophèles examinés (39,13 p. 100), pour *Pl. præcox*, celui de 8 infections sur 15 Anophèles examinés (53,3 p. 100).

Ces chiffres témoignent de la grande réceptivité des moustiques de l'Yonne et des environs de Paris à l'égard de l'infection palustre.

B. — Démonstration du pouvoir infectant des Anophèles parisiens soumis a l'infection palustre.

Expérience d'auto-inoculation.

La première question qui se posait, sur la possibilité pour les Anophèles des régions indemnes de contracter le paludisme, étant ainsi résolue, restait, pour achever la démonstration, à établir expérimentalement le pouvoir infectant réel de ces moustiques. On pouvait, en effet, se demander si les Anophèles porteurs de sporozoïtes étaient effectivement pathogènes pour l'homme. Tout en considérant cette démonstration comme superflue, étant donnée la marche normale de l'infection chez les moustiques, j'ai cependant tenu à la réaliser. L'expérience a été faite dans les conditions suivantes :

Expérience (1). — Le 28 août, un des Anophèles de l'expérience I, au 15e jour de son infection au *Pl. vivax*, est porté sur mon bras.

Le moustique pique immédiatement, mais on ne le laisse pas se nourrir. La durée de la piqûre n'excède pas trois quarts de minute. L'insecte est alors retiré, sacrifié et soumis à l'examen. Des sporozoïtes sont vus assez nombreux dans les glandes salivaires.

Résultat. — Dès le 8e jour, commencent à se manifester de la céphalée et des douleurs névralgiques dans la région du cou et des épaules, douleurs d'abord diffuses puis plus accusées, surtout au réveil, donnant la sensation d'un véritable torticolis. Le 13 septembre, dans l'après-midi, céphalée marquée et lassitude; température, à 19 heures, 38°5. Frisson. Le 14, au matin, l'examen du sang, négatif les jours précédents, révèle des schizontes assez nombreux de *Pl. vivax* (schizontes de 20-24 heures, normaux).

L'accès prochain est coupé par la quinine (chlorhydrate) à doses alternées de 1 à 2 grammes par jour pendant une semaine. La céphalée et les douleurs articulaires cèdent très rapidement au traitement quinique; les hématozoaires disparaissent dès le 2e jour. Après 15 jours de repos, les symptômes douloureux prémonitoires réapparaissent, nécessitant la reprise de la cure quinique pendant une semaine. Guérison apparente pendant les 7 mois de période froide.

Rechute de printemps, le 17 avril 1918, décelée par une céphalée intense périoculaire, un état nauséeux et des douleurs névralgiques intensifiées à l'épaule droite (déjà perceptibles depuis environ une semaine). Pas d'élévation thermique notable. Temp., 36°8. L'examen du sang révèle des hématozoaires très rares (*P. vivax*), absents dans les frottis, visibles seulement en goutte épaisse. La formule leucocytaire montre une mononucléose marquée (20 p. 100 de grands mononucléaires).

(1) Durant mes séjours antérieurs dans les régions tropicales, j'ai eu à enregistrer quelques accès du type paludéen. Depuis 4 ans en France, aucune récidive ne s'est produite et je n'ai jamais constaté d'hématozoaires dans mon sang. Au moment de l'expérience, le taux des grands mononucléaires était normal.

Le traitement quinique est repris à 1 gramme par jour par périodes de 2 jours alternées de 2 jours de repos. Frisson et accès à 39°, le 18 avril. Hématozoaires non visibles sur frottis ni en gouttes épaisses. Sous l'influence de la cure quinique la mononucléose a complètement disparu le 3 mai (taux des grands monos, 5 p. 100) (1).

Il est intéressant de comparer les résultats de notre expérience d'inoculation, avec celle, aujourd'hui classique, de Th. Manson, qui eut lieu à Londres en 1900 avec des Anophèles infectés d'Italie. La coïncidence des dates et des résultats est curieuse.

Le fils de Patrick Manson se fit piquer à partir du 29 août, et vit apparaître les premiers symptômes fébriles le 13 septembre. Après une guérison apparente de plus de 8 mois, une rechute eut lieu le 1er juin de l'année suivante.

Dans mon expérience la piqûre eut lieu le 28 août, et le début des symptômes fébriles s'est manifesté le 13 septembre; la période de guérison apparente a été de 7 mois, avec rechute le 17 avril.

Le rapprochement des dates n'est pas sans intérêt, car il fait ressortir la fixité du cycle du parasite de la tierce bénigne, qu'il soit originaire de Macédoine ou d'Italie. On voit en particulier, dans les deux cas, la récidive se produire au retour des mois chauds, après une période de guérison apparente prolongée qui coïncide avec les mois les plus froids. Schaedel (2), dans un travail récent, a fait également ressortir que les maxima de récidives malariennes s'observent de juin à septembre, coïncidant, par suite, avec les maxima de température annuels.

En résumé, il résulte de notre ensemble d'expériences que les Anophèles de la région parisienne sont parfaitement aptes à propager le paludisme, et ne constituent nullement une race réfractaire particulière. L'absence de l'affection palustre dans notre région relève par conséquent d'une autre cause que celle de l'immunité des moustiques. Nous la discuterons plus loin.

(1) Le traitement ayant été suspendu le 14 juin, une nouvelle rechute s'est encore manifestée le 2 juillet.

(2) *Biol. Centralbl.*, t. XXXVIII, n° 4, avril 1918.

II

ÉTUDE DE L'INFECTION EXPÉRIMENTALE DES MOUSTIQUES PARISIENS

Les infections expérimentales réalisées sur les Anophèles de la région parisienne m'ont permis de préciser, par des observations diverses, certaines questions relatives à l'évolution sexuée des Plasmodium du type tierce et d'apporter ainsi quelques faits nouveaux à l'étude de l'infection palustre considérée chez le moustique.

A. — Conditions influençant l'infection.

Les conditions variées d'humidité et de température, sous lesquelles ont été réalisées les expériences, montrent que l'infection des moustiques n'est pas influencée par les circonstances extérieures si la température nécessaire au développement des formes est réalisée.

Les moustiques n'ont pas contracté d'infection plus intense en air humide qu'en air sec, ou à l'étuve à 25-27° C. qu'à la température du laboratoire (17-20° C.). Alors que la sécheresse de l'air nuit directement aux Anophèles et ne leur permet pas une conservation prolongée, le développement sporocystique des parasites ne s'en accomplit pas moins. Quant à la température, son action se manifeste surtout sur la rapidité du développement des parasites, comme nous le verrons ci-après.

Pendant le mois d'octobre, la température moyenne étant inférieure à 16° C., je n'ai pas obtenu de développement, ce qui confirme les expériences de Grassi, de Jancso, etc. Mais mes expériences n'ont porté que sur un petit nombre de moustiques, d'ailleurs soumis à une invasion mycélienne qui a pu nuire directement au développement des zygotes.

Les seules conditions qui m'ont paru influencer le développement chez le moustique tiennent à l'état des parasites eux-mêmes dans le sang circulant des malades. Certains malades porteurs de gamètes sont infectants pour les moustiques, d'autres ne le sont pas, sans qu'il soit possible d'en donner exactement les

raisons qui tiennent vraisemblablement à l'âge et au sexe des gamètes. Ainsi, dans la deuxième expérience réalisée avec le *Pl. vivax*, seul le malade X..., sur les cinq paludéens qui ont pris part à l'expérience, a infecté les Anophèles.

Lorsqu'un paludéen présente des gamètes aptes à l'évolution sexuée, on peut dire que tous les Anophèles sains qui se gorgent de son sang contractent l'infection. On peut voir en effet que, dans la plupart de mes expériences qui ont donné un résultat positif, tous les moustiques ayant piqué se sont infectés. Au contraire, dans les cas négatifs, aucun moustique ne s'infecte.

Dans l'expérience n° 3, relative à la tierce maligne, aucun des 5 moustiques nourris sur le malade L... ne s'est infecté. Or il a été impossible de déceler l'existence de croissants mâles parmi les croissants femelles nombreux que renfermait le sang circulant de ce malade. On peut admettre ainsi que la disparition de l'un des sexes des gamètes, si elle pouvait être obtenue par une médication appropriée, en l'absence de cure plus effective, rendrait de grands services au point de vue prophylactique. Pour Ziemann (1) les croissants mâles seraient facilement détruits par la quinine à laquelle les croissants femelles sont résistants. Mais cette notion qui pourrait avoir son importance n'a pas été reconnue comme fondée par D. Thomson (2).

B. — Observations a l'appui de la dualité spécifique des parasites du type tierce.

L'infection obtenue chez les Anophèles parisiens a été en général plus intense pour le *Pl. præcox* que pour le *vivax*. Toutes les infections obtenues avec le parasite de la tierce bénigne ont été faibles ou très faibles. Même dans le cas du moustique qui a servi à mon expérience d'auto-infection, les glandes salivaires étaient peu chargées de sporozoïtes, ce qui n'a point empêché un haut développement du pouvoir infectant. Avec le parasite de la tropicale, au contraire, les infec-

(1) « Malaria », *Traité* de Mense, t. III, 1906, p. 473.
(2) *Ann. of trop. Med. Paras.*, t. VI, 1912, p. 224.

tions des moustiques ont été en général massives, les glandes salivaires surchargées de sporozoïtes.

L'étude de l'évolution sexuée des *Pl. vivax* et *Pl. præcox* fournit des arguments de grande valeur à l'appui de la dualité spécifique de ces formes, question encore si contestée. Si, dans le sang humain, la succession épidémiologique si frappante des deux tierces a conduit beaucoup d'auteurs, avec Laveran, à les interpréter comme deux modalités d'un seul et même parasite, chez le moustique, au contraire, le cycle évolutif de chacune des deux formes manifeste une individualité constante, à la fois par des caractères morphologiques et par des caractères physiologiques.

Différences morphologiques entre les deux formes. — Il est facile de différencier à l'état vivant les zygotes jeunes des deux tierces. Mes observations, à cet égard, confirment celles de Stephens et Christophers, de Bastianelli et Bignami, de Darling, etc. Le zygote de *vivax* a une réfringence moindre, une couleur plus grisâtre, un contour extérieur moins net. Ses grains de pigment se présentent en petites traînées ou chaînettes grêles et peu distinctes, de coloration gris jaunâtre (fig. 1, n°s 4-5). Le zygote de la tierce maligne présente au contraire un contour très net, très apparent, une réfringence parfaite qui lui donne l'aspect d'un petit globule vitreux. Le pigment est réparti en gros grains irréguliers, de coloration noire franche, parfaitement visibles (fig. 1-3); on distingue encore nettement ces grains de pigment chez des zygotes âgés (zygotes du 10e jour à 25°C. mesurant de 35 à 45 μ (fig. 2), alors qu'ils ne sont plus visibles à ce stade, chez le *vivax*.

Différences physiologiques. Durée d'évolution comparée des deux formes. — Indépendamment de ces différences morphologiques, j'ai pu reconnaître, entre les deux parasites, des différences marquées dans le temps d'évolution. Ces différences, qui n'ont point encore été nettement mises en évidence par les auteurs, sont d'autant plus accusées que la température à laquelle s'est accompli le développement est plus basse.

Ainsi, à la température constante de 25°C., à l'étuve, j'ai obtenu le développement complet du *Pl. vivax* en *11 jours*

(Exp. I, repas infectant le 13 août, sporozoïtes déjà présents dans les glandes le 24 août, mais des sporocystes non éclatés

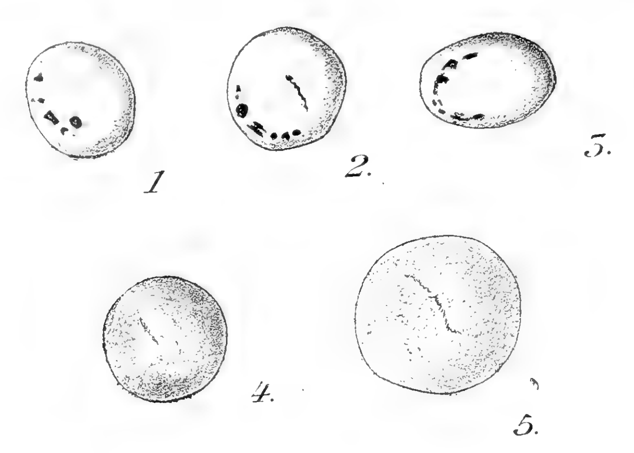


Fig. 1. — Aspect comparé des Zygotes des deux tierces, à l'état frais.

1-3. *Pl. præcox*. Zygotes de 14 μ (7e jour d'infection à la température ordinaire). Aspect vitreux. Gros grains de pigment noir.
4-5. *Pl. vivax*. Zygotes de 28-35 μ (11e jour d'infection). Aspect terne, faiblement réfringent. Pigment en chaînettes diffuses, grisâtres.

sont encore visibles. — Exp. II, des sporozoïtes sont trouvés dans les glandes, le 8 septembre, 12 jours après le repas



Fig. 2. — *Pl. præcox*. — Zygotes de 38-45 μ (10e jour d'infection à 25° C.)
Les grains de pigment noirs sont encore très apparents. (Le contour irrégulier des kystes est dû à la compression.)

infectant du 27 août; il n'existe plus de sporocystes non mûrs).

A la même température, l'évolution du parasite de la tierce maligne demande *au minimum 14 jours*. Ainsi, un moustique

de l'exp. II, infecté le 3 sept. et placé à l'étuve, montre le 17 sept. des sporozoïtes libres dans la cavité générale et un léger début d'infection des glandes salivaires; mais le plus grand nombre des sporocystes, qui sont tous mûrs et chargés de sporozoïtes, n'ont pas encore, à ce moment, libéré leur contenu. On compte encore 15 sporocystes sur la paroi de l'estomac. Ces sporocystes éclatent sous la pression de la lamelle. On saisit donc ici la limite inférieure d'apparition de l'infection salivaire : cette infection ne fait que commencer à se manifester le 14e jour.

Un autre moustique provenant de la 1re expérience (30 août) placé dans les mêmes conditions de température, et examiné le 12e jour (11 sept.), ne montrait pas encore de sporozoïtes mûrs dans les sporoblastes sporocystiques.

A une température comprise entre 15 et 23° C., avec moyenne de 17-20° C., l'évolution du *Pl. vivax* demande environ 15 jours, celle du *præcox* 20 jours.

Ainsi, chez un Anophèle infecté le 7 sept. au parasite de la *tierce bénigne*, j'observe, le 22 sept., 17 sporocystes mûrs qui laissent échapper leurs sporozoïtes sous la pression de la lamelle. L'infection salivaire est donc ici imminente. C'est un stade correspondant à celui du 11e jour à 25° C. Chez un autre moustique provenant d'une autre expérience (exp. III), examiné le 17 sept., 11 jours après son repas infectant, l'estomac ne présente encore que des sporocystes jeunes (25-35 μ) sans sporoblastes apparents; d'après leurs dimensions ces sporocystes sont à un stade correspondant à celui des sporocystes de 6-7 jours à 25° C.

On voit donc que le *Plasmodium vivax* évolue chez le moustique d'une façon sensiblement plus rapide que le *Pl. præcox*. La différence qui est déjà d'au moins trois jours à 25° C., de 5 jours à 17-20° C., serait certainement beaucoup plus marquée encore au voisinage de la limite thermique inférieure d'évolution des deux parasites (16-17° C.), parce qu'alors la longueur relative du cycle sexué s'accroît considérablement.

Les chiffres obtenus dans mes expériences sont assez voisins de ceux qu'a observés Jancso (1) dans ses remarquables

(1) *Centralbl. f. Bakt. Orig.*, t. XXXVIII, 1905, p. 650.

recherches relatives à l'action de la température sur le développement des parasites malariens. La même espèce anophélienne est en cause. Cet auteur a observé entre autres que la maturation des sporocystes du *vivax* demande 10 jours à 24° C., 19 jours à 21° C. (température constante), celle du *Pl. præcox* 20 jours à 20° C.; mais la comparaison précise n'a pas été établie entre les deux formes pour la même température et l'auteur n'en a rien pu conclure au sujet de la distinction des deux parasites.

A Panama, Darling (1) a bien reconnu que le zygote de la tierce bénigne diffère de celui de la « subtierce » par une plus grande rapidité de développement. Le zygote de la bénigne mesure 48 μ le 9e jour, et le jour suivant les sporozoïtes commencent à apparaître dans les glandes salivaires, tandis que le zygote de la tierce maligne ne mesure que 30 μ le 12e jour. Les indications relatives au degré thermique font défaut. Il s'agit très certainement d'un moyenne voisine de 25° C.

Ces différences constantes dans la longueur relative du cycle évolutif des deux formes, considérables puisqu'il s'agit pour la tierce maligne d'une durée d'un tiers supérieure à celle du cycle de la bénigne, ne plaident guère en faveur de la thèse de l'unicité des deux parasites. Jointes aux différences morphologiques constatées chez les zygotes et qui sont également constantes, appuyées d'autre part, par les nombreuses expériences d'inoculation anophélienne qui reproduisent toujours chez l'homme la forme correspondant à l'infection du moustique, elles fournissent au contraire un argument solide et logique en faveur de l'individualité spécifique de chacun des types de *Plasmodium* de la tierce.

Interprétation de la différenciation saisonnière et géographique des deux tierces, d'après la durée du cycle sexué. — Les différences constatées dans la longueur relative du cycle sexué des parasites me paraissent d'autre part susceptibles de fournir une explication plausible aux particularités de succession saisonnière des deux formes de la tierce et à certaines inconnues de leur dispersion géographique.

(1) Factors in the transmission and prevention of Malaria in the Panama canal zone. *Ann. of trop. Med. Paras.*, t. IV, 1910-11, p. 179.

On sait que, dans les pays tempérés où coexistent les deux Plasmodium, c'est le *vivax* qui se manifeste en premier dans les accès fébriles printaniers de nouvelle invasion, tandis que le *præcox* prédomine en été et en automne (forme estivo-automnale).

Les constatations épidémiologiques récentes, faites à l'armée d'Orient, confirment nettement cette périodicité (1).

Or, l'apparition première du *Pl. vivax* se conçoit fort bien comme une conséquence directe de sa rapidité plus grande d'évolution chez l'Anophèle. Si, à une moyenne de 17-20° C., la différence dans la durée des deux cycles n'est que de 5 jours, à température plus basse, 15-16°, on verrait sans doute cette marge s'accroître dans des proportions considérables, puisque la rapidité de développement des zygotes est alors infiniment ralentie. Dans ses expériences, Jancso estime à 53 jours la durée nécessaire à la maturation complète des sporocystes du *vivax* à 15-17° C., qui représente la température-limite de développement des Plasmodium de la tierce. C'est là d'ailleurs une durée tout à fait anormale et qui, aussi bien d'après les expériences de cet auteur que d'après celles de Mitzmain (2), ne paraît pas conciliable avec l'achèvement normal du cycle des parasites ; mais il est permis de penser qu'un délai d'évolution de 20 à 25 jours pour le *vivax*, qui correspondrait sans doute pour le *præcox* à 30-35 jours d'évolution, doit représenter un temps d'évolution normal pour les basses températures du printemps.

On saisit donc qu'à cette saison ce sont les sporozoïtes du *vivax* qui infecteront largement les premiers les glandes salivaires des Anophèles, et c'est par suite la tierce bénigne qui se manifestera en premier dans le tableau clinique.

L'avance prise par le *Pl. vivax* dès les premiers jours de l'activité anophélienne se traduira par une invasion plus précoce du milieu humain ; il est logique d'en conclure que, dans la concurrence des deux parasites, le *vivax* prendra le pas au début sur le *præcox*. Lors des nouvelles infections printanières des moustiques, lorsque ce dernier parasite, ayant achevé son

(1) Armand-Delille, Paisseau et Lemaire, *Bull. Soc. path. exot.*, t. X, n° 4, 11 avril 1917.

(2) *U. S. Publ. Health Repts*, t. XXXII, n° 25, 31 août 1917.

évolution sporogonique, commencera à pouvoir être diffusé par les Anophèles, il trouvera le terrain d'invasion, c'est-à-dire le milieu humain, largement envahi déjà par le parasite de la tierce bénigne. Dans la grande majorité des cas, ce seront donc des infections mixtes qui vont se produire ; mais, en raison de l'avance prise dans le sang humain par les générations asexuées du *vivax*, il est légitime de penser que la présence du *præcox* passera, dans ces cas, au début, inaperçue. Elle ne se révélera que plus tard, dans le cours de l'été et en automne, lorsque, aidées par leur virulence plus grande, et peut-être par des réinfection multiples, les générations asexuées du parasite de la tropicale auront pris à leur tour le rôle prépondérant et dominé le tableau clinique en masquant l'infection première.

Le rappel ultérieur, hivernal, du *Pl. vivax*, dans les cas de paludisme secondaire, résultera sans doute du phénomène inverse : le *vivax* réapparaît chez les malades atteints d'infection mixte lorsque le *præcox* a épuisé sa virulence première.

La concurrence victorieuse exercée au début de la saison chaude par le *Pl. vivax* sur le *Pl. præcox*, concurrence qui est fonction de sa rapidité de développement chez l'Anophèle, permet enfin de comprendre la quasi-exclusivité de l'agent de la tierce bénigne dans les régions tempérées à paludisme peu intense, comme la France.

La tierce maligne autochtone est si rare en France que la question de sa transmission possible par les Anophèles de nos régions a été récemment discutée par différents auteurs. Pour Marchoux (1), il y aurait guérison spontanée de cette forme fébrile sous le climat français, en vertu de réactions humorales. Mais la disparition progressive du *Pl. præcox*, chez la plupart des malades, n'empêche pas dans certains cas le maintien prolongé du parasite et la persistance des croissants pendant un temps largement suffisant pour la diffusion de l'affection par nos Anophèles.

Pour Lagriffoul et Picard (2), l'absence de l'agent de la tropicale en France s'explique par des raisons climatiques, le

(1) *Bull. Soc. Path. exot.*, t. XI, n° 1, 9 janvier 1918, p. 1-3.
(2) *Bull. Soc. Path. exot.*, t. X, n° 10, 12 décembre 1917, p. 883, et t. XI, n° 2 13 février 1918, p. 73.

præcox ayant besoin d'une température plus élevée que le *vivax* pour son évolution chez le moustique. Il en résulte que le parasite de la tierce maligne ne doit guère trouver que dans les régions méridionales de notre pays la température-limite nécessaire à son existence.

Cette manière de voir, plutôt théorique d'ailleurs, renferme une part de vérité bien qu'elle ne cadre pas absolument avec les données de l'expérience et les observations de cas autochtones à *Pl. præcox*. Nous avons vu que les Anophèles de la région parisienne étaient au moins aussi faciles à infecter de *Pl. præcox* que de *Pl. vivax*, à la température de 17-20° C. qui est loin d'être une température propre au Midi. A la température de 25° C., l'évolution est accélérée, mais les infections ne sont ni plus sûres ni plus intenses qu'à température plus basse. La chaleur seule n'est donc pas en cause d'une manière absolue dans la dispersion géographique plus franchement tropicale de cette forme.

Les expériences de Jancso, auxquelles nous avons déjà renvoyé, établissent d'ailleurs avec une grande rigueur que la limite thermique inférieure d'évolution, chez le moustique, des deux parasites de la tierce est la même ; il s'agit dans les deux cas de moins de 16° C. Les réactions thermiques des deux formes sont si comparables que l'auteur en conclut nettement à l'impossibilité d'expliquer par la température extérieure les différences observées dans leur répartition géographique et saisonnière.

Mais si, au point de vue absolu, les conditions de température réalisées sous le climat français en été et au début de l'automne sont parfaitement compatibles avec le développement du *Pl. præcox*, ce que confirment nos expériences et les cas de tierce maligne observés, il n'en est pas moins vrai qu'un facteur limitant doit exister, qui entrave l'extension de ce parasite dans notre pays et la réduit d'une manière importante. Ici encore, nous nous trouvons amenés à faire intervenir, pour expliquer les faits, la concurrence du *Pl. vivax*, liée à son développement plus rapide, qui masque et contrarie les générations asexuées du *præcox* d'une manière désavantageuse pour l'établissement de l'endémicité de la tierce maligne.

Il est facile de concevoir, en raisonnant comme plus haut, qu'en raison de la température peu élevée, les différences dans la durée du cycle sexué des deux formes sont plus accusées en France que dans les régions plus méridionales. L'invasion plus nettement précoce du *Pl. vivax*, qui prédomine ainsi largement le premier dans le tableau clinique, gêne l'autre forme et fait que le champ libre laissé sous notre climat au développement chez l'homme des gamètes du *Pl. præcox* est d'autant plus restreint. La période de manifestation estivo-automnale du parasite se trouve ainsi très abrégée. Par conséquent, la concurrence de la forme la plus précoce jointe au petit nombre des Anophèles dans des régions à paludisme peu intense sont autant de facteurs qui enlèvent au parasite de la tierce maligne des chances de s'implanter sérieusement dans nos régions. Dans les régions plus chaudes, au contraire, la température extérieure plus élevée accélérant le cycle sporogonique des deux formes tend, on l'a vu, à réduire les différences de durée qui existent entrent elles, et l'équilibre se trouve rétabli rapidement au profit de la forme la plus virulente. Nous sommes ainsi amenés à une conception somme toute assez voisine de celle de Lagriffoul et Picard, puisqu'elle fait jouer le rôle prépondérant aux actions thermiques extérieures, mais d'une façon plus complexe et moins directe : l'action seule de la température, comme l'expérience le montre, n'est pas suffisante pour l'interprétation des faits. Il faut aussi largement tenir compte d'un autre facteur dominant, qui ne peut être pour nous que la concurrence physiologique des deux formes dans le milieu humain.

C. — Infection mixte des Anophèles aux deux tierces. Absence d'immunité pour une deuxième infection.

Les données épidémiologiques montrent que dans les pays tempérés où les deux formes de tierce se succèdent, la tierce bénigne apparaît en premier. En réalité, l'apparition beaucoup plus tardive de la tierce maligne n'est, pour nous, qu'un aspect produit par la concurrence, dans le milieu humain, des deux parasites qui y coexistent le plus souvent en infections mixtes, masquées.

J'ai recherché si un même moustique pouvait contracter, à faible intervalle, une infection simultanée pour les deux formes.

Expérience. — Un Anophèle a été nourri le 30 août sur le malade *B*... porteur de croissants, et conservé au laboratoire à une moyenne de 17 à 20° C. 11 jours plus tard, le 10 septembre, le même moustique est nourri sur le malade *Ch*..., porteur de gamètes de tierce bénigne (infection pure).

Le moustique est sacrifié et examiné le 24 septembre. Il est alors au 25e jour de son repas infectant de tierce maligne, au 14e jour de son repas de tierce bénigne. Dans ces conditions, les sporocystes de la première infection doivent avoir libéré leurs sporozoïtes et l'on ne doit retrouver sur la paroi de l'estomac que des sporocystes de la deuxième infection à un stade voisin de la maturation. On constate, en effet, que les glandes salivaires sont bourrées de sporozoïtes correspondant à l'infection la plus ancienne (tierce maligne). Cette infection est déjà achevée depuis plusieurs jours, car on ne trouve dans la cavité générale thoracique ou abdominale aucun sporozoïte correspondant à la période de migration de ces éléments vers les glandes salivaires. D'autre part, sur la paroi de l'estomac sont visibles 6 sporocystes de 48-50 μ, à sporoblastes n'ayant pas encore libéré leurs sporozoïtes, mais à un stade peu éloigné de la maturation et correspondant manifestement à l'infection la plus récente (tierce bénigne).

Ainsi, un Anophèle déjà infecté par l'une des deux formes peut contracter simultanément une deuxième infection pour l'autre forme. On peut donc concevoir que les sporozoïtes des deux types de tierce puissent coexister dans les glandes du même moustique dont la piqûre conférera d'emblée dans ces conditions une infection mixte.

Si l'on admet l'unité spécifique des deux formes, cette expérience démontrerait aussi qu'une première infection plasmodienne ne confère pas d'immunité au moustique, fait déjà établi pour le Plasmodium des oiseaux par les Sergent (1). On ne serait donc pas fondé à expliquer par ce mécanisme l'exis-

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, avril 1907.

tence de races d'Anophèles réfractaires au paludisme par immunité acquise, suivant l'hypothèse de Celli et de Schaudinn.

D. — Durée de conservation des sporozoïtes dans les glandes salivaires. Disparition du pouvoir infectant des Anophèles au cours de l'hibernation.

Les données relatives à la durée de conservation des sporozoïtes dans les glandes salivaires des moustiques sont peu nombreuses et se réduisent à quelques faits concernant les *Plasmodium* des oiseaux qui évoluent chez les Culex. On sait qu'un moustique infecté n'épuise pas son pouvoir infectant au cours d'une seule piqûre, mais qu'il peut, par des piqûres successives, infecter plusieurs oiseaux. Ed. et Ét. Sergent (1), en particulier, ont démontré que des Culex infectés sur un oiseau porteur de *Plasmodium relictum* peuvent non seulement transmettre leur infection à un premier canari neuf, mais encore à un deuxième canari. Là paraît se borner d'ailleurs la durée de maintien du pouvoir infectant des Culex, car un troisième oiseau piqué par ces moustiques ne s'infecte pas.

Les mêmes auteurs (2) signalent cependant chez des Culex infectés, en état d'hibernation, l'existence de vieux sporozoïtes d'hiver provenant d'une infection datant déjà de 1 à 2 mois. On est ainsi amené à suspecter une conservation hivernale possible des sporozoïtes dans les glandes salivaires des moustiques.

En ce qui concerne les *Plasmodium* du paludisme humain, peu de faits expérimentaux précis sont venus étayer les hypothèses permises sur ce sujet. Il y a cependant, au point de vue épidémiologique, un grand intérêt à connaître la durée de conservation de l'infection malarique chez les Anophèles, et à préciser le rôle joué par ces derniers dans la conservation hivernale de l'endémicité.

La plupart des auteurs qui ont traité de l'épidémiologie malarique en Europe admettent cependant que l'hibernation malarienne ne se produit pas chez le moustique, en d'autres termes que la conservation en hiver, d'une année à l'autre des parasites malariens, ne se fait pas par l'intermédiaire des Anophèles,

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, avril 1907.
(2) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 24 août 1908.

mais de l'homme. Les observations de Martini (1) en Allemagne, de Martirano (2) en Italie, celles de Schoo (3) en Hollande sont d'accord pour montrer que l'infection disparaît en hiver chez l'Anophèle.

Des recherches diverses, effectuées durant ces dernières années dans le Sud des États-Unis par Mitzmain (4), vont pleinement à l'appui de cette manière de voir. Cet auteur a pratiqué en hiver, dans des localités palustres diverses, des dissections portant sur plus de 3.000 Anophèles. Chez aucun d'entre eux il n'a rencontré de traces d'infection plasmodienne de février au commencement de mai.

Cette absence d'infection des Anophèles, en hiver, semble due tout d'abord à l'arrêt de développement des zygotes sous l'influence du froid. Des expériences récentes du même auteur (5), confirmant celles antérieures de Grassi, de Schoo, de Jancso, etc., sur le même sujet, établissent nettement que lorsque les sporocystes ont été retardés dans leur développement, d'une manière anormale, par une température insuffisante agissant pendant un temps prolongé, ils ne sont plus susceptibles d'achever leur évolution, même si les moustiques sont remis à température favorable. Le froid empêche par conséquent la formation des sporozoïtes en hiver.

Mais les observations et les expériences de Mitzmain n'éclairent pas la destinée des sporozoïtes qui ont pu se former et parvenir dans les glandes salivaires des Anophèles avant l'hiver. Lorsqu'un moustique s'est infecté à l'arrière-saison, à température encore suffisante pour permettre l'achèvement complet de l'évolution des parasites, on peut se demander ce que deviennent, au cours du repos hivernal, les sporozoïtes qui sont inclus dans les glandes salivaires, et s'il ne sont pas aptes à conserver l'affection palustre jusqu'au printemps. Les expériences réalisées en Hollande par Schoo (6) semblent montrer qu'il n'en est rien. Des Anophèles infectés en octobre par cet

(1) *Zeitsch. f. Hyg. u. Infekt.*, t. XLI, 1902, p. 147-166.
(2) *Atti. d. Soc. p. g. Studi d. Malaria*, t. III, 1902, p. 475-531.
(3) *Atti d. Soc. p. g. Studi d. Malaria*, t. IV, 1903, p. 85-91.
(4) *U. S. Pub. Health Repts*, juillet 1915, p. 2117 et *U. S. Pub. Health Serv.*, Washington, décembre 1916.
(5) *U. S. Pub. Health Repts*, t. XXXII, n° 35, 31 août 1917.
(6) *Loc. cit.*

auteur, et conservés sans autre alimentation que de l'eau jusqu'en mars et avril, n'ont plus montré aucune trace d'infection à cette époque. Il y aurait disparition hivernale de l'infection salivaire par une voie non précisée.

L'expérience ci-après que j'ai réalisée confirme le fait et fournit quelque lumière sur ce point particulier.

Expérience. — Un lot de cinq *Anopheles maculipennis* éclos de larves provenant du bois de Meudon ont été nourris le 30 août sur le malade *B...*, paludéen de l'armée d'Orient, porteur de croissants de *Pl. præcox*. *Trois* de ces moustiques, examinés à des temps variant de 7 à 12 jours plus tard, montrent tous les trois une infection sporocystique intense. Un *quatrième*, disséqué le 25e jour, décèle l'achèvement de l'évolution : les glandes sont bourrées de sporozoïtes, malgré deux repas de sang frais, l'un le 18e, l'autre le 20e jour. Le *cinquième* moustique est conservé sur jus sucré au Laboratoire (temp. : max. 24° C., min. 4° C.). Le 21 novembre (2 mois et demi après l'infection), il pique pour la première fois un singe, sans se nourrir. Le 22 novembre, il pique une souris et un cobaye ; le 14 décembre, il se gorge sur un cobaye (soit seulement deux repas de sang complets depuis l'infection).

Le 14 décembre (106e jour après l'infection), le pouvoir infectant de l'Anophèle est alors *mis à l'épreuve par piqûre sur mon bras*. Le moustique pique sans se nourrir. Résultat : *Aucune infection ne se produit*; les hématozoaires n'apparaissent pas dans le sang.

Le 4 janvier (4 mois et 5 jours après le repas infectant), le moustique est sacrifié et examiné. L'une des deux glandes salivaires se montre complètement vide de sporozoïtes. Dans la seconde glande quelques sporozoïtes seulement sont encore visibles, mais pour la plupart sous des formes d'involution, arquées, en S, etc. Il n'y a pour ainsi dire plus de sporozoïtes normaux.

Il faut conclure de cette expérience que non seulement les glandes salivaires se déchargent du plus grand nombre de leurs sporozoïtes au bout d'un nombre de piqûres relativement peu élevé, mais encore que les sporozoïtes, s'ils n'ont pu être

évacués, dégénèrent lentement dans le tissu des glandes ou le milieu salivaire et deviennent inaptes à la transmission de l'affection palustre. La conservation prolongée du pouvoir infectant chez l'Anophèle infecté n'apparaît pas possible. Au contraire de l'infection salivaire trypanosomienne des glossines, qui est le plus souvent durable et se maintient jusqu'à la mort de la mouche infectée, par multiplication directe sur place des trypanosomes dans le liquide salivaire, comme je l'ai établi, l'infection salivaire plasmodienne des Anophèles ne paraît être qu'une infection temporaire et fugace.

Cette expérience ne porte malheureusement que sur un seul Anophèle; mais, venant après celles des auteurs déjà cités, elle est manifestement convaincante. Ed. et Ét. Sergent viennent d'ailleurs tout récemment de lui apporter une confirmation nouvelle en constatant expérimentalement la disparition de la virulence du *Plasmodium relictum* des oiseaux chez des Culex, après plusieurs mois d'hibernation (1).

Il ressort de cet ensemble de faits qu'on ne saurait envisager le milieu salivaire des moustiques comme un milieu d'hibernation réel pour les sporozoïtes malariens. Ces éléments peuvent se conserver pendant un temps assez long, voire pendant des mois, dans les glandes salivaires des Anophèles hibernants, qui ne les évacuent pas puisqu'ils ne prennent plus de repas de sang. Mais ils dégénèrent alors progressivement sur place et, avant d'avoir complètement disparu, perdent toute virulence. Les moustiques ne peuvent donc à aucun point de vue être considérés comme des hôtes durables pour les parasites malariens : ce rôle est dévolu à l'homme.

III

CONSIDÉRATIONS SUR L'ANOPHÉLISME SANS PALUDISME ET LES DANGERS RÉELS D'EXTENSION DU PALUDISME EN FRANCE

Nos expériences ont donc établi que les Anophèles français d'une région non palustre, comme la région parisienne, ne doivent pas à une immunité particulière leur absence d'infec-

(1) *Bull. Soc. Path. exot.*, t. XI, n° 4, 10 avril 1918.

tion naturelle. Ces moustiques, s'ils sont mis en contact avec du sang de paludéens chargé d'éléments sexués aptes à l'évolution sporogonique, s'infectent à coup sûr, aussi bien que les Anophèles des régions où sévit l'endémie palustre. L'expérience justifie donc, en principe, les craintes formulées par Léger et Mouriquand (1), R. Blanchard (2), Würtz (3), etc., au sujet de l'extension du paludisme en France du fait de la guerre, et les mesures prises à cet égard par le Service de Santé.

Des cas d'infection isolés, voire même de petites épidémies de paludisme autochtone, ont d'ailleurs été constatés ces temps derniers dans des régions très diverses du territoire français par différents observateurs; le plus souvent il s'agit du *Pl. vivax*, mais dans quelques cas, le *Pl. præcox* est également en cause. On est donc fondé à redouter également l'implantation sur notre sol de la forme tropicale de la tierce.

Ces craintes sont-elles réellement bien justifiées? Il est incontestable qu'étant donnée l'introduction massive en France d'un nombre inusité de paludéens d'origines diverses, les Anophèles locaux ont plus de chances de s'infester actuellement qu'avant la guerre. Mais s'ensuit-il pour cela que l'on ait sérieusement à redouter de voir s'étendre et se multiplier d'une façon durable les zones palustres endémiques de notre territoire? Nous ne le pensons pas.

La question de l'établissement de l'endémicité palustre dans une région est, en effet, plus complexe qu'elle ne le paraît *a priori*. Les trois facteurs nécessaires : homme, virus, Anophèle vecteur, ne suffisent pas, par eux seuls, à donner naissance à l'endémie. Il faut tenir compte aussi des conditions qui favorisent les relations nécessaires entre ces trois éléments et particulièrement des facteurs biologiques facilitant la fréquence et la continuité des rapports entre les deux hôtes fermant le cycle de l'évolution malarienne, l'homme et l'Anophèle.

Les parasites malariens ne trouvant, comme nous l'avons vu, que dans le sang de l'homme leur milieu de conservation durable, il faut pour que se maintienne à l'état latent, à un

(1) *Soc. médico-chirurgicale XIVe région*, 5 décembre 1916 et *Soc. méd. des Hôp.*, Paris, 18 janvier 1917.
(2) *Bulletin de l'Académie de Médecine*, août 1917.
(3) *Monde médical*, juillet 1917.

degré quelconque, l'infection des moustiques d'une localité donnée, condition d'où dépend l'établissement de l'endémicité palustre, que des relations fréquentes et continues puissent s'établir entre l'homme réservoir de virus et les Anophèles locaux.

Des relations passagères, quasi exceptionnelles entre les deux hôtes, compromettent la continuité du cycle et tendent à suspendre l'endémie. Il n'y a donc chances de voir s'implanter, d'une manière définitive, dans une localité ou une région donnée, l'endémie palustre, que là où les Anophèles et l'homme vivent en contact suffisamment intime et soutenu l'un avec l'autre; en d'autres termes, que là où les Anophèles, moustiques plus particulièrement campagnards, deviennent des moustiques domestiques, hôtes assidus des habitations humaines. Il se passe là un fait analogue à celui que j'ai signalé pour l'endémicité de la trypanosomiase humaine en Afrique : la maladie du sommeil ne sévit pas partout où il y a des *Glossina palpalis* et des porteurs possibles de trypanosomes. Elle s'installe endémiquement de préférence là où les Glossines tendent à vivre en permanence aux dépens exclusifs de l'homme, par suite de l'absence ou de la rareté d'autres hôtes capables de subvenir à leur alimentation.

Les conditions nécessaires pour que des relations intimes entre l'homme et les Anophèles puissent s'établir en France sont encore mal connues. On peut dire seulement que ces moustiques passent le plus souvent inaperçus et que la présence des larves à proximité d'habitations et au sein d'agglomérations humaines n'implique nullement pour cela que les moustiques adultes fréquentent l'homme et se nourrissent de son sang d'une manière habituelle. Edmond et Étienne Sergent (1) ont fort bien attiré l'attention sur la rareté des *A. maculipennis* dans les maisons de la banlieue de Paris et de la vallée de l'Essonne, région à Anophèles sans paludisme, par opposition avec leur abondance relative dans les maisons des villages et des bourgs de Vendée où sévit l'endémie palustre. J'ai pu moi-même constater l'exactitude de ces observations en ce qui concerne les stations à Anophèles des environs de Paris. Mais,

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie,* 14 novembre 1903.

l'abri des Anophèles dans les maisons ne signifie pas forcément d'ailleurs que ces moustiques y recherchent l'homme pour le piquer.

Les habitudes hémophages des Anophèles de nos régions sont si discrètes que les anciens diptérologues ont même pu douter des aptitudes de ces moustiques à piquer et à sucer le sang. Meigen (1), qui a créé le nom de genre *Anopheles* et l'a différencié du g. *Culex*, mentionne, d'après Linné, que la larve de l'*A. bifurcatus* vit dans l'eau, mais que *le moustique adulte ne pique pas*. Cette assertion de Linné est également reproduite par Macquart (2) qui s'appuie sur elle pour exprimer l'opinion que tous les culicidés ne sont point des suceurs de sang : « D'après Linné, le *Culex bifurcatus* qui est un Anophèle ne pique pas ». Plus près de nous, Schiner (3) écrit de même, au sujet des Anophèles en général : « *Doch ist mir nicht bekannt, dass die Weibchen Blut saugen.* »

Si, pour des professionnels aussi qualifiés de l'observation entomologique, la question des facultés hémophages des Anophèles de nos pays a pu ainsi se poser, c'est évidemment parce que les habitudes sanguinaires de ces insectes nécessitent pour leur manifestation des circonstances très particulières et qu'elles échappent à l'examen courant. On pourrait sans doute retrouver, dans l'étymologie du mot *Anopheles*, la trace des incertitudes régnant à l'époque de Meigen, au sujet des facultés vulnérantes de ces Culicides. C'est certainement par erreur que Meigen donne à ce vocable l'équivalent du mot : importun (*beschwerlich*), comme il le fait avec juste raison pour le nom de genre *Aëdes*. Etymologiquement le terme *Anopheles* signifie simplement : qui est sans utilité, qui n'est bon à rien (ὄφελος — utilité, avantage), mais on ne saurait y lire nettement, par suite, un caractère nuisible ou gênant rigoureusement déterminé.

Quoi qu'il en soit, ce qu'il importe pour nous de retenir de ces constatations diverses, c'est que, sous nos climats, les Anophèles autochtones ne manifestent, peut-on dire, qu'exceptionnellement, vis-à-vis de l'homme, leurs habitudes sanguinaires. C'est là un fait d'une grande importance, car il fournit une expli-

(1) *Syst. Beschr. d. bek. Europ. zweifl. Ins.*, t. I, 1818, p. 10.
(2) *Hist. nat. des Insectes. Diptères.* Paris, 1834-35.
(3) *Fauna austriaca. Die Fliegen*, t. II, 1864, p. 625.

cation logique à la question si discutée de l'anophélisme sans paludisme.

Serait-ce à dire que dans les régions non palustres, comme le pense Celli, les Anophèles ont perdu l'habitude de piquer l'homme? Certainement non. Il est de notion bien établie que les Anophèles européens piquent de préférence dans certaines conditions d'ombre ou d'humidité et ces conditions paraissent très strictes. L'observation suivante m'a permis de reconnaître que l'*A. maculipennis* de nos régions ne recherche pas l'homme dans des habitations à découvert, même sises à proximité de ses lieux de développement, mais qu'il pique en plein air, suivant certaines zones particulières, humides et proches de marais boisés. De telles zones peuvent être désignées sous le terme de *zones de vol* ou *zones de chasse* de ces moustiques.

Dans la Somme, au village de Pierrepont-Hamel, près Montdidier, j'ai observé, en octobre 1914, un vol important d'*A. maculipennis*, vers 5 heures du soir, dans une prairie en pente douce sise en lisière immédiate d'une futaie marécageuse qui s'étend sur les bords de l'Avre. Les dernières maisons du village de Pierrepont se trouvent à l'extrémité relevée de cette prairie, à 100 mètres à peine de la futaie marécageuse, mais complètement en dehors d'elle. Les Anophèles voletant au ras du sol venaient piquer les hommes d'une formation sanitaire au repos dans la zone basse et humide de la prairie, à la lisière de la futaie. Or, bien qu'ayant passé plus de deux mois dans le village lui-même, couchant dans une maison qui donnait directement sur la prairie en question, mais en dehors de la zone humide, je n'y ai jamais constaté la présence des Anophèles ni souffert de leurs piqûres.

Il faut donc admettre que l'*A. maculipennis,* comme sans doute aussi le *bifurcatus*, ne vole pas au hasard à une distance même faible de ses gîtes de ponte, pour trouver sa nourriture dans les maisons, mais qu'il possède, au dehors, des zones de vol déterminées et constantes, dans l'étendue desquelles seulement il se répand à la recherche d'hôtes quelconques qui l'alimentent, tandis qu'en dehors de ces zones ses piqûres ne sont pas à redouter. L'étendue de ces zones de vol doit varier selon les conditions extérieures et aussi selon les facilités plus ou

moins grandes d'alimentation sanguine que peuvent trouver autour d'eux les moustiques. Le fait d'ailleurs a été démontré pour les Anophèles du canal de Panama par J. Le Prince et Orenstein (1). Ces auteurs ont établi qu'à heure fixe, au coucher du soleil, un vol dense d'Anophèles, d'une longueur inusitée et provoqué sans doute par les nécessités d'alimentation, se produisait dans une direction constante allant des lieux de ponte aux habitations de Gatun, souvent à plus de 1 kilomètre, suivi par un vol de retour inverse, à l'aurore. Ce vol se déclenche brusquement et s'arrête de même, avec une précision mécanique, lorsque le jour s'abaisse ou reparaît.

En captivité, j'ai constaté chez l'*A. maculipennis* de France semblable précision dans les habitudes. Les moustiques conservés au repos, au laboratoire, à l'abri de toute excitation extérieure, passent brusquement de l'état de repos à l'activité de vol, lorsque le crépuscule paraît, qu'ils soient ou non placés à l'obscurité. Ce réveil mécanique, qui déclenche le vol de chasse et de nutrition, est indépendant des circonstances extérieures et lié à un rythme physiologique particulier. Il indique une précision toute spéciale dans les habitudes encore mal connues de ces moustiques.

Il est clair que si des habitations humaines se trouvent établies dans la zone de chasse habituelle des Anophèles, elles seront infestées par eux en permanence et les habitants piqués fréquemment au cours du vol, tandis qu'en dehors de cette zone les maisons voisines ne pourront être l'objet que de raids sans importance de la part des moustiques égarés hors de leurs limites de chasse habituelles. Les conditions idéales propres à faciliter la vie en commun de l'homme et des Anophèles, dans nos régions, paraissent être celles d'habitations isolées, établies *au ras du sol* au sein de zones boisées humides, marécageuses. De telles conditions, qui sont primitives, sont devenues l'exception en France.

Dans les régions anciennement insalubres comme les Dombes, la Sologne, le paludisme a disparu à la suite de l'assèchement de grandes étendues marécageuses et des progrès de la culture.

(1) *Mosquito Control in Panama*. New-York et Londres, Putnam, 1916, chapitre VII.

Or cette disparition ne coïncide pas d'une manière absolue avec celle des Anophèles qui s'observent toujours en très grand nombre dans les nappes d'eau subsistantes. Il faut donc penser que les modifications telluriques qui ont fait rétrocéder l'infection malarienne sont intervenues surtout en restreignant l'étendue des zones de vol des Anophèles, ou en écartant de ces zones le plus grand nombre des habitations humaines. Les maisons, maintenues désormais en dehors des zones marécageuses librement fréquentées par les moustiques, ont été soustraites ainsi à la visite permanente des Anophèles qui ne s'aventurent plus dans leur ambiance immédiate.

Ainsi, l'explication de l'*anophélisme sans paludisme*, dans nos régions, doit être surtout cherchée, selon nous, dans l'organisation des groupements humains en dehors des zones de parcours de chasse des Anophèles.

Les conditions spéciales créées par la guerre ont, dans beaucoup d'endroits, réalisé des conditions inverses, en suscitant l'établissement de campements plus ou moins durables dans les zones de vol des moustiques, en plein air, au niveau du sol et à proximité de marais boisés. Ainsi ont pu et pourront encore prendre naissance, sous l'influence d'un quelconque apport de virus, de petits foyers de paludisme autochtone. Mais cet envahissement par l'homme des zones de vol des Anophèles, qui est dû à des conditions de vie primitives, exceptionnelles, prendra fin avec la guerre; on peut dès lors escompter du même coup l'extinction rapide des petits foyers de paludisme ainsi engendrés.

L'exemple de la Sologne et des Dombes où l'amélioration des conditions de la vie humaine par les grands travaux de desséchement a amené la disparition du paludisme sans celle des Anophèles, celui des nombreuses régions indemnes d'affection palustre en Europe où subsistent cependant ces moustiques, sont là pour montrer que, dans les régions tempérées tout au moins, le paludisme peut être vaincu simplement par des mesures propres à disjoindre la vie commune de l'homme et des Anophèles, sans aller jusqu'à la destruction complète de ces derniers, tâche souvent irréalisable. Ce résultat a jusqu'ici été obtenu surtout d'une manière empirique. Il appartiendra à

l'avenir de préciser cette donnée dans ses détails par une connaissance plus approfondie de la biologie des Anophèles, et en particulier par une détermination rigoureuse des conditions capables de développer ou de suspendre les relations de ces moustiques avec l'homme.

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

32e ANNÉE OCTOBRE 1918 N° 10

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de E. Metchnikoff.

L'ANTIGENO
PER
LA PROVA DELLA FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO
NELL' INFEZIONE VACCINICA VAIOLASA

per il Dott. O. CASAGRANDI,
Prof. ord. di Igiene e direttore dell' Istituto d'Igiene
della R. Università di Cagliari (1).

Un certo numero di autori, dopo gli importanti studi del Bordet e Gengou sulla fissazione del complemento, hanno cercato nel siero di animali e di uomini inoculati con vaccino bovino e rispettivamente di malati di vaiolo e di animali inoculati con virus vaioloso umano, la presenza di sensibilizzatrici specifiche ora con esito positivo, ora con esito negativo.

Essendo uno dei primi ad occuparmi di tale questione nell' infezione vaccinica (*Boll. Soc. Cultori Sc. med. e nat.* Cagliari, 4 e 25 Maggio 1907), non essendovi prima delle mie, altre

(1) Attualmente nella R. Università de Padova : la presenta memoria rimonta all' aprile 1914.

ricerche che quell' dell' Jobling (*Journ. of. Exp. med.*, nov. 1906) ed il primo ad occuparmene nell' infezione vaiolosa umana (*Policlinico*, Roma, 29 Marzo 1908) studiandone, sotto questo riguardo, i rapporti coll' infezione vaccinica, ho avuto campo di persuadermi che la condizione essenziale perché sulla prova del Bordet e Gengou si possa contare nelle due su citate infezioni, consiste nella buona preparazione dell' antigeno.

Nel presente lavoro intendo quindi trattare della metodica della fissazione del complemento nel vaccino e nel vaiolo considerando solo la questione della preparazione dell' antigeno.

Alle mie prime ricerche sul vaccino che rimontano al Maggio del 1907, eseguite con vaccino filtrato, seguirono quelle dello Zedda (*Rif. med. Napoli*, num. 51, 1907), altre mie (*Annali Igiene Roma*, pag. 557, 1907); dell' Heller e Tomarkin (*Deut. med. Woch.*, 1907, pag. 795), le mie nuove sul vaiolo umano (*loc. cit.*), del Beinkter (*Centr. f. Bakt. I Abt. Orig.*, Bd. 48, 17 Dic. 1908), altre mie ancora (*Annali Igiene Roma*, pag. 305, 1909), del Bernbach (*Centr. f. Bkt. I Abt. Orig.*, Bd 49, 25 Marzo 1909), del Sugaï (*Id.*, *ib.*, pag. 650), del Dahm (*Id.*, *ib.*, Bd 51 pag. 136, 1909), del Xilander (*Id.*, *ib.*, pag. 290), del Kriloff (*Id.*, *ib.*, Bd 60, 1 Nov. 1911), del Paschen e Iocobstal (*Hand. d. Techn. u. Meth. d. Imm.*), del Bizzarri e Palmas (*Pathologica Genova.*, Dic. 1911), del Tessier e Gastinel (*Rev. int. vaccine*, pag. 353, 1903), sino alle ultime del Gastinel (*Réact. d'infect. et d'imm. de la vaccine et la variole*, Paris, G. Steinheil, 1913).

Durante le molteplici osservazioni da me fatte, parte pubblicate, parte inedite, ho intanto potuto assodare fatti che indubbiamente influiscono sulla prova che é riuscita positiva ad un certo numero dei succitati studiosi e negativa ad altri, servendosi tutti, in genere, come antigeno di linfa o di estratto di materiale pustolare in siero fisiologico.

Non v'ha dubbio che il virus vaccinico conservato in glicerina, ove la glicerina non venga separata dal virus rende il liquido antigenico, che si ottiene facendo un estratto in acqua salata, poco adatto alla prova del Bordet e Gengou.

Ancora, per ottenere una buona triturazione del vaccino, ove si ricorra a pestare il materiale pustoloso con quarzo, allorché si raggiunge il massimo di perfezione nella triturazione del

materiale, il liquido antigenico assume proprietà di assorbire il complemento in grado elevato; e ciò é dovuto alla presenza della silice che resta in sospensione come é già stato dimostrato in altro ordine di ricerche, da altri studiosi (*Hailer Arb. a. d. Kais. Ges.*, t. XXIX, 1909).

Il fenomeno anzi si osserva anche quando la triturazione si faccia in mortaio di porcellana rugosa per la presenza del caolino che si stacca dal mortaio e che si comporta nello stesso modo.

Di qui ne dedussi le necessità : *di privare la polpa vaccinica, da cui si deve estrarre l'antigeno, della glicerina, e l'altra di condurre la triturazione in mortaio d'agata o in mortaio di porcellana a superficie liscia e senza aggiunta di quarzo.*

Ho inoltre notato che per ottenere un estratto del materiale vaccinico in acqua salata, in tali condizioni da aversi un antigeno né troppo diluito, né troppo concentrato, *occorre partire da una determinata quantità pesata di vaccino e fare la diluizione entro limiti che vogliono essere ben precisati.*

A mio modo di vedere, lo scopo si raggiunge seguendo la metodica che comunicai per lettera al Dottor Gastinel (V. *Réactions d'infection e d'immunité, etc.*, Paris, 1913, pag. 63), e che consiste nel diluire il contenuto pesato di un tubo del vaccino del commercio (in acqua salata al 0,85 p. 100) nelle proporzioni di 1 a 50, centrifugarlo tre volte successivamente ricambiando l'acqua salata, triturare il deposito cosi lavato in mortaio, e aggiungere nuova acqua salata fino ad ottenere una diluizione di 1 a 20; centrifugare infine sino ad avere un liquido appena opalescente.

Anche così operando ho pero potuto constatare, servendomi della prove del Calmette e Guérin, che in nessun caso si riesce a trovare un quantitativo identico di virus negli estratti. Mantenendo in ghiacciaia gli antigeni e, dopo eseguita la prova del Calmette e Guerin, diluendo quelli più ricchi di virus fino a portarli ad una diluizione tale che si possa avere ancora una eruzione confluente, interessante tutta la superficie della pelle, e concentrando d'altro canto nel vuoto a bassa temperatura tutti quegli estratti che permettevano, adoperati tal quali, di ottenere delle pustole separate l'una dall' altra ; seminando la medesima quantità di estranto, non sono con tutto questo

riuscito ad ottenere liquidi antigenici che si comportassero nell' identico modo. Le esperienze mi hanno condotto soltanto ad accertare che *a parità di volume gli antigeni più ricchi di virus sono migliori di quelli meno ricchi di virus.*

Ma non é questo solo fattore quantitativo del virus, quello a cui si deve la costanza del potere antigenico nel materiale che si prepara, poiché quando invece di ricorrere al vaccino del commercio, mi son rivolto al vaccino fresco non conservato con la glicerina, ed ho ripetuto le stesse ricerche, ho dovuto convenire *che gli antigeni i quali si ricavano da questi vaccini freschi, possedevano proprietà antigeniche più fisse*, tanto da poter contare su di essi per le prove del Bordet e del Gengou, quasi senza incertezze.

Il Gastinel che ha già pubblicato il risultato delle sue ricerche eseguite precisamente con antigeno ricavato da polpa vaccinica fresca, ha ritrovato giustamente superiore questo antigeno all' altro ricavato dal vaccino del commercio.

*
* *

Per cui, oltre che la quantità del virus, ha indubbiamente importanza nella buona preparazione dell' antigeno se non la vitalità e la virulenza del virus, la freschezza della coltura dello stesso.

Questa é stata la osservazione la quale mi ha portato a ricercare un antigeno nel quale il virus si trovasse in condizione di coltura recente.

Fin dal 1907 avevo tentato di coltivare il virus vaccinico facendo punto di partenza di tutte le mie ricerche colturali, materiali contenenti il solo virus. La pratica acquisita nella filtrabilità del virus vaccinico e vaioloso mi permetteva di poter preparare dei filtrati sicuramente privi di altri germi visibili e coltivabili, servendomi di candele Berkefeld W opportunamente scelte e controllate.

Con questi filtrati ho eseguito un gran numero di esperimenti con risultati negativi. Aggiungendo anche ad essi elementi cellulari epitheliali i resultati non migliorarono poichè, se questi elementi si sterilizzavano, non erano più atti alla

moltiplicazione del virus, se non si sterilizzavano sopraweniva lo sviluppo dei batteri; per cui non eravi alcuna ragione di preferire queste colture (che sono del resto scarsissime) anche seguendo i procedimenti moderni delle colture dei tessuti in vitro, come hanno fatto recenti studiosi (Belin, *Revue int. vaccine*, page 128, 1913; Steinhardt e Lambert, *Journ. of. inf. dis.*, pag. 294, 1913, e pag. 87, 1914), alla polpa vaccinica fresca.

Anche le cosi dette colture del Fornet (*Revue int. vaccine*, page 93, 1913) (dato che si tratti di colture, cio che io non credo) non foss' altro che per questo motivo, non servono allo scopo, e cosi pure le recenti del Belin non si prestano (*loc. cit.*). Per mio conto del resto non sono riuscito a ritrovare mai completamente depurato il virus vaccinico con l'essenza di garogani.

Son quindi ritornato alla mie ricerche sulla coltivabilità del virus vaccinico nei leucociti, ricerche che sommariamente esposi fin dal 1910 (*Boll. Soc. Cultori di Sc. med. e nat.* Cagliari, 16 Aprile 1910).

Premetto che l'intervento dei leucociti nella infezione vaccinica é nota da molto tempo e che Prowazech e Iamamoto (*Münch. med. Woch.*, pag. 26, 37; 1909) hanno in seguito all' inoculazione endoperitoneale di aleuronato, nei conigli, assodato che nei leucociti si racchiudeva il virus, ed io l'ho anche trovato nei leucociti del sangue dei polli inoculati con vaccino. (*Revue int. vaccine*, pag. 3, 1910.)

* * *

Il tecnicismo adatto allo scopo va distinto in tre tempi corrispondenti, l'uno alla preparazione del virus, l'altro alla preparazione dei leucociti, il terzo alla preparazione delle colture.

1° *Preparazione del virus.*

a) Si puo partire da vaccino del commercio glicerinato : il vaccino si introduce in una candela o crogiuolo poroso, vi si versa sopra della miscela citrosodica in quantità rilevante e poi si fa l'aspirazione nel recipiente sottostante : con cio il vaccino viene levato e privato dalla glicérina.

b) Si raccoglie il vaccino lavato, lo si tritura secondo la tecnica più volte

da me esposta per rendere filtrabile il virus, ma in presenza di miscela citrosodica sterilizzata e bollita. (Acqua dist. 1000, cloruro di sodio 9, citrado di sodio 15.)

c) Si filtra il materiale ben triturato attraverso Berkefeld W ben scelte e controllate dopo la sterilizzazione e si distribuisce il filtrato preferibilmente in tubi da saggio forniti di una ditatazione laterale a bolla a circa 5 cm. dal fondo, i quali tubi debbono contenere in precedenza una quantità tale d'olio d'anilina da raggiungere l'altezza di 1 cm. il tutto preventivamente sterilizzato in autoclave. Di filtrato se ne introduce quella quantità che è sufficiente a far quasi raggiungere al menisco dell' olio di vasellina il punto cui risponde il bordo inferiore del foro della dilatazione a bolla della provetta.

La distribuzione dei filtrati si puo fare al coperto di ogni inquinamento servendosi di adatto apparecchio di cui ho fornito la descrizione nel 1907 (*Annali di Igiene*, 1907, pag. 570, nota).

2° *Preparazione dei leucociti.*

a) Si prepara del l'aleuronato sterile secondo la tecnica adatta a estrarre la legumina (*Rempicci. R. Soc. Igiene Milano*, 1901) come piogeno; lo si divide in fiale de 10 cm. l' una, ognuna delle quali si inocula interamente nel cavo peritonale di un coniglio.

b) Si estrae il liquido dopo 4-6 ore dal cavo peritoneale mettendosi nelle volute condizioni per evitare ogni inquinamento dall' esterno e lo si introduce in provette da centrifuga sterilizzate contenenti una certa quantità di miscela citrosodica: si lava, si centrifuga, quindi si decanta rapidamente il liquido e si aspira il deposito con pipette sterilizzate contenenti 1 cm. c. di miscela citrosodica sterile, la quale serve a disgregare il deposito, ed il tutto si fa pervenire nel filtrato contenente il virus.

3° *Preparazione del colture.*

a) Si obliquano i tubi da saggio a bolla in modo che tutto l'olio di vasellina passi nella bolla.

b) Si toglie il tappo d'ovatta e rapidamente si introduce nell' interno di ogni tubo tutta la sospensione dei leucociti raccolta con la pipetta dai tubi da centrifuga; si tappa di nuovo e si radrizzano i tubi.

c) Le provette innestate si pongono in termostato allo scuro entro un recipiente in cui sia stato fatto il vuoto e vi si sia mantenuto.

Procedendo in questo modo nell' interno dei leucociti, al termine di una settimana si troveranno, osservando in campo oscuro, dei granuli fini, mobili i quali per grandezza, forma e mobilità si comportano come i grani vaccinici vaiolosi della cheratite vaccinale vaiolosa, segnalati da me in preparati colorati fin dal 1906 nel vaccino (*Annali di Igiene*, 1906, pag. 128), e dal Volpino in preparati a fresco nel 1907 (*Riv. Igiene San. Pubbl.*, 1907, pag. 734) e cosi caratteristicamente descritti da quest' ultimo da meritare di essere chiamati i corpuscoli del Volpino.

Questo reperto granulare non si nota nei preparati di controllo contenenti i leucociti.

*
* *

Ottenute così le colture del virus nei leucociti, per la preparazione dell' antigeno, non resta che aspirare da ciascun tubo l'olio di vasellina, mescolarne bene il contenuto, travasarlo in tubi da centrifuga e centrifugarlo fino ad ottenere un deposito.

Ciò fatto si decanta il liquido sovrastante e per due volte di seguito si lava questo deposito con cloruro sodico al 0,85 p. 100, quindi lo si raccoglie in mortaio di porcellana non rugosa o addirittura in mortaio d'agata, triturandolo accuratamente, dopo aver eliminata per decantazione o per evaporazione nel vuoto quasi tutto il liquido che può impedire una buona triturazione del materiale corpuscolare. Quando la triturazione é giunta al punto desiderato, si aggiunge goccia a goccia del cloruro sodico al 0,85 p 100 sino a che si ottiene una diluizione del materiale tritato nei rapporti di 1 a 20.

Si centrifuga ancora una volta sino ad ottenere un liquido appena opalescente *che é l'antigeno da adoperare.*

Le prove eseguite con questo antigeno in confronto con quelle fatte con l'estratto di polpa vaccinica fresca, sono state oltremodo confortanti, giacché fino ad ora non ho incontrato più alcuno di quei risultati o incerti o contradditori che, anche sperimentando con quest' ultimo, qualche volta continuava ad avere.

*
* *

Concludendo : nelle prove della fissazione del complemento secondo la tecnica del Bordet e Gengou applicata alla infezione vaccinica e vaiolosa, riuscite or positive ed or negative, in mano a diversi studiosi, ha grande importanza il modo di preparazione dell' antigeno. E' già una buona metodica quella di ricorrere al vaccino fresco privo di glicerina, tritato con esclusione di silice e di caolino e centrifugato in presenza di siero fisiologico fino ad ottenere un liquido appena opalescente. Si può però ottenere un antigeno che dia risultati più costanti e più probativi partendo da filtrati contenenti il solo virus, con l'aggiunta di leucociti sterili ricavando poi dal deposito leuco-

citario (quando nei leucociti si rinvenga, in campo oscuro, il reperto di fini granuli mobili), un estratto in siero fisiologico, appena opalescente. Questo antigeno ha i seguenti vantaggi : 1° é costituito dal solo virus indovato in elementi cellulari senza la presenza di esseri viventi che vi si sviluppino più o meno rigogliosamente; 2° contiene il virus vivo e virulento come si dimostra innestandolo sulla cute dei conigli e sulla cornea degli stessi ; 3° permette di poter eseguire dei controlli con antigeni ricavati dallo stesso materiale leucocitario senza la presenza del virus.

A PROPOS DE LA VITALITÉ DU GONOCOQUE

par V. MORAX.

Il m'a paru intéressant d'étudier certaines conditions de vie du gonocoque et en particulier la durée de la cellule microbienne. Nous ne possédons, en effet, que peu de renseignements sur ce sujet. On confond souvent la vitalité d'une culture avec la vitalité du micro-organisme lui-même. Je voudrais montrer la différence considérable qui existe entre ces deux phénomènes.

La reproduction des micro-organismes se fait, on le sait, avec une rapidité remarquable. Gotschlich estime que pour le vibrion cholérique, dans le bouillon peptoné placé à l'étuve à 37°, la division complète de la cellule bactérienne se poursuit en un temps compris entre 19 et 40 minutes. Si les conditions de développement sont modifiées, si, par exemple, le tube de bouillon peptoné est placé à 22° au lieu de 37°, la division du vibrion exige un temps quatre fois plus considérable. On désigne le temps écoulé à partir de la formation de la cellule microbienne jusqu'à la division complète par l'expression de « *durée de génération* ». Cette durée de génération qui correspond à la vie d'une cellule en pleine activité, n'a rien de commun avec la durée de la vie de cette même cellule placée en dehors des conditions de température où sa multiplication est encore possible. C'est ce que je désignerai par les termes de *durée individuelle* de la cellule microbienne pour l'opposer à la « durée de génération ».

Ce n'est en effet qu'en supprimant la possibilité de la division microbienne que nous pouvons apprécier la durée individuelle d'un micro-organisme. Encore faut-il que ce micro-organisme ne produise pas des formes de résistance. Dans le cas de bacilles sporogènes, on peut encore étudier la longévité des spores, mais non celle des bacilles qui les ont formés.

L'étude du gonocoque se prête tout particulièrement à ces

études puisqu'il s'agit d'un organisme dépourvu de forme de résistance, dont l'habitat naturel est l'espèce humaine et qui perd ses propriétés de multiplication lorsque la température s'abaisse de plus de 8 à 10° au-dessous de la température du corps.

Au cours de recherches sur ce micro-organisme, ses conditions de culture et de conservation ont retenu tout particulièrement mon attention et j'ai comparé entre eux un très grand nombre de gonocoques d'origine différente.

Je ne m'attarderai pas à discuter la valeur des nombreux milieux de culture proposés. Je dirai seulement qu'en dehors de la gélose-ascite, la gélose à l'œuf de Besredka et Jupille m'a seule donné des récoltes aussi abondantes et que l'on peut mettre les deux milieux au même rang au point de vue du rendement. Tous les observateurs ont remarqué qu'en très peu de jours les colonies de gonocoques développées sur de la gélose-ascite inclinée ne peuvent plus être repiquées sur un autre tube alors même que la culture est maintenue à l'étuve, à une température convenable. Dans le cours de l'Institut Pasteur, j'ai indiqué depuis près de quinze ans que pour conserver longtemps une culture de gonocoque vivante, deux conditions étaient nécessaires : se servir de gélose-ascite en culot et ensemencer le milieu par piqûres; laisser le tube dans l'étuve entre 34 et 37°.

Dans de telles conditions, on voit la colonie de gonocoques s'étaler à la surface du culot de gélose-ascite, mais, en même temps, on remarque que les couches les plus superficielles du milieu se troublent. Le long du trait d'ensemencement l'opacification indiquant le développement des gonocoques ne s'étend guère à plus d'un demi-centimètre de la surface du milieu, ce qui témoigne bien du caractère aérobique du gonocoque. Je n'ai jamais réussi une culture strictement anaérobie et d'ailleurs l'examen de ce qui se passe dans les tubes ou dans les ballons de bouillon ascite est en concordance avec ce que je viens d'exposer.

Les cultures en gélose-ascite en culot, maintenues à l'étuve, peuvent rester vivantes pendant plus d'une année. J'ai eu plusieurs fois l'occasion de faire l'expérience qui consiste à repiquer une culture datant de six mois, d'un an, de dix-huit

mois. En voici une à titre d'exemple. Elle a porté sur trois gonocoques d'origine distincte.

	DATE de L'ENSEMENCEMENT	DATE du REPIQUAGE	TEMPS ÉCOULÉ
Gonocoque Nib. . .	1914. 26 janvier.	1914. 8 juillet.	6 mois et demi.
Gonocoque Barb. . .	1913. 15 octobre.	1914. 8 juillet.	8 mois et demi.
Gonocoque Chap . .	1913. 21 mars.	1914. 8 juillet.	14 mois et demi.

Cette expérience prouve donc qu'en gélose-ascite en culot, à la condition que la température de l'étuve se maintienne dans certaines limites (inférieures à 39° et supérieures à 30°), à la condition encore que le milieu de culture ne se dessèche pas (il faut que le tube soit capuchonné), le gonocoque se conservera en vie pendant plus d'un an.

Je suppose aussi que l'ascite qui a servi à faire le milieu nutritif est riche en albumine, qu'elle a été éprouvée et reconnue apte à donner de belles récoltes de gonocoque.

Lorsqu'on cherche à analyser ce qui se passe dans une culture faite comme je l'ai indiqué, on constate tout d'abord qu'abandonnée hors de l'étuve, la culture meurt après quelques jours. En prélevant dans les couches superficielles du culot de gélose ascite un peu du milieu ensemencé et en le transportant sur gélose-ascite inclinée à l'étuve à 37°, on obtient des colonies de repiquage à la condition que la colonie mère n'ait pas séjourné plus de 3 à 9 jours à une température inférieure à la température de prolifération du gonocoque.

C'est entre 3 et 9 jours que l'on peut estimer la durée individuelle de la vie de la colonie, ou si l'on veut des gonocoques qui la composent.

Si l'on compare quelques gonocoques de provenances différentes, on constate que, toutes les autres conditions étant égales, certains d'entre eux auront toujours une durée individuelle de 3 jours, d'autres de 5 jours, d'autres de 9 jours, etc.

Voici, par exemple, le résultat d'une de nos expériences. On voit que le gonocoque Nib. n'a qu'une durée individuelle inférieure à 5 jours alors que le gonocoque Barb. est encore vivant après 8 jours.

	APRÈS 2 JOURS hors de l'étuve	APRÈS 5 JOURS hors de l'étuve	APRÈS 6 JOURS hors de l'étuve	APRÈS 8 JOURS hors de l'étuve
Gonocoque Nib.	+	—	—	—
Gonocoque Ler.	+	—	—	—
Gonocoque Urèt.	+	—	—	—
Gonocoque Bo.	+	+	—	—
Gonocoque Barb.	+	+	+	+

Le signe + indique que le repiquage a été positif et le signe — le contraire.

Je me suis assuré que cette propriété de durée individuelle n'avait rien d'éphémère et qu'on pouvait la mettre en évidence pour le même organisme après un grand nombre de repiquages.

La température de la chambre peut offrir de grandes variations et il fallait se demander si cette durée individuelle du gonocoque était influencée par les différentes températures (inférieures à la température de prolifération du gonocoque).

J'ai choisi pour expérimenter 3 températures que je pouvais avoir d'une manière constante et régulière + 22°, + 10° et + 5°. Ces deux dernières températures étaient réalisées dans des glacières.

Le tube de gélose-ascite en culot dans lequel la culture du gonocoque était bien développée était placé pendant 2 à 8 jours à l'une des températures indiquées et l'on procédait à des repiquages réguliers :

Les résultats ont été identiques que le tube fût placé à 22°, 10°, ou 5°; je me contenterai de citer un exemple.

		A 5°	A 10°	A 22°
Gonocoque Bo... .	Après 5 jours	+	+	+
— Bo... .	Après 8 jours	—	—	—
Gonocoque Barb...	Après 6 jours	+	+	+
— Barb...	Après 8 jours	+	+	+

Des expériences qui précèdent, je crois pouvoir conclure que ce qui assure la vitalité d'une colonie de gonocoque, c'est la

possibilité pour le microbe de se multiplier dans des conditions particulières. Dès l'instant que les conditions de prolifération n'existent plus, la vitalité de la colonie équivaut en durée à la durée individuelle du gonocoque et celle-ci est variable (dans de faibles proportions) suivant la race du gonocoque étudié.

Depuis les expériences de Piringer, il est établi que la dessiccation exerce sur le pus gonococcique une action rapidement destructive. Cette action s'exerce de la même manière sur le gonocoque provenant de cultures en milieux artificiels. Les indications précédentes ne s'appliquent évidemment que dans les conditions que j'ai précisées, c'est-à-dire le gonocoque se trouvant dans un milieu nutritif favorable, tel que si la température en était convenable, il pourrait y proliférer pendant des mois.

En résumé, il ressort des expériences relatées :

1° Que la conservation des cultures de gonocoque est facile même sur les milieux nutritifs couramment employés, tels que gélose-ascite par exemple. Dans le tube ensemencé en piqûre et placé à 37°, *la vitalité de la colonie* peut être mise en évidence après plus d'un an.

2° A cette vitalité de la culture placée dans des conditions de température permettant la prolifération du micro-organisme, il faut opposer la *vitalité de l'élément microbien* lorsqu'il ne peut se reproduire par division, c'est-à-dire lorsque la température s'abaisse assez fortement au-dessous de la température du corps humain, habitat naturel du gonocoque.

La vitalité du gonocoque, dans ces conditions, est d'assez courte durée : 3 à 9 jours.

Tel gonocoque dont la durée individuelle est de 7 jours conservera cette propriété même après plusieurs mois de culture en milieux artificiels. Cette propriété n'est pas modifiée par des températures basses (+ 10° ou + 5°).

3° Il semble possible d'attribuer la vitalité des cultures en gélose-ascite au fait que la prolifération du gonocoque se poursuit, d'une manière ralentie il est vrai, dans les couches superficielles du milieu de culture. C'est à cette continuité de division que l'on doit de pouvoir repiquer la culture après un délai aussi considérable que celui que nous avons signalé.

SUR UNE BACTÉRIE DE L'EAU VÉGÉTANT DANS LES VINS AMERS CAPABLE DE DÉSHYDRATER LA GLYCÉRINE GLYCÉRO-RÉACTION

par E. VOISENET.

Dans un précédent mémoire (1), j'ai fait connaître l'existence dans les eaux d'un ferment possédant des propriétés semblables à celles d'un Bacille végétant dans les vins amers, antérieurement isolé et étudié par moi (2) : en particulier, chacun de ces êtres est capable de *déshydrater* la *glycérine* en la transformant en *acroléine*.

J'ai complété l'étude comparative de ces deux bactéries, en l'étendant en même temps à d'autres microbes pouvant se rencontrer dans les eaux, comme le *B. Coli*, les Bacilles *Typhique* et *Paratyphiques*.

Voici les conclusions de cette étude dont le développement est exposé dans ma thèse de doctorat (3).

I. — L'ensemble des caractères morphologiques, biologiques, culturaux et biochimiques du Bacille isolé de l'eau, comparés à ceux du Bacille retiré d'un vin amer, affirme une étroite ressemblance entre les deux êtres.

Chacun d'eux est capable, par ensemencement dans un milieu vineux favorable, de reproduire la maladie de l'amertume des vins avec ses caractères organoleptiques, microscopiques et chimiques; en particulier, en donnant naissance, aux dépens de la

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVIII, p. 807, 1914.
(2) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 153, p. 363, 1911 et t. 156, p. 1181, 1913.
(3) Étude du *Bacillus amaracrylus*, agent de déshydratation de la glycérine. *Thèse de doctorat ès sciences physiques*. Paris, décembre 1917.

glycérine, à de l'aldéhyde *acrylique*, substance dont j'ai reconnu la formation dans tous les vins atteints de la maladie de l'amertume proprement dite, jeunes ou vieux.

Tous deux doivent représenter une seule et même espèce, que, pour ces raisons d'habitat, de fonction physiologique à l'égard de la glycérine et pathologique à l'égard du vin, j'ai dénommée « *Bacillus amaracrylus* » : le microbe des eaux constituant l'espèce type; celui des vins amers pouvant être considéré comme cette espèce elle-même, aux qualités héréditaires simplement modifiées par l'adaptation nécessaire avec son nouveau milieu nutritif, ou pour le moins comme une variété.

Cette identification nous montre comment l'introduction de l'eau dans le vin qui, pratiquement, ne peut être évitée, soit aussi bien au cours de la vinification que pendant la mise en bouteille, doit apporter le germe de la maladie.

II. — Ce microbe des eaux présente des analogies et des différences avec le *B. Coli* et les bacilles *Typhique* et *Paratyphiques*.

Comme eux, il végète en bouillon phéniqué à 1 p. 1.000, à la température de 42°.

Par son caractère de *ferment lactique*; par l'action sur les milieux colorés, soit au tournesol, soit au rouge neutre, ou incolores, comme celui d'Endo à la rosaniline, il se rapproche du Bacille d'*Escherisch* et se distingue du Bacille d'*Eberth* ou même des *Paratyphiques*.

L'absence de production d'indol conduirait à un résultat inverse de comparaison, s'il n'était établi que des types de Colibacilles, de la variété *anindolicus*, sont incapables d'engendrer cette substance.

Deux propriétés fondamentales, l'une biologique, l'autre chimique, différencient ce microbe de ceux auxquels nous le comparons présentement, et qui sont, au moins l'un d'eux, des hôtes encore trop fréquents des eaux.

Propriété biologique. — Il n'est pas pathogène.

Propriété chimique. — Il produit la fermentation acrylique de la glycérine.

ESSAI DE CLASSIFICATION DE CETTE BACTÉRIE DE L'EAU

Alors que le Bacille *Typhique* offre une constance remarquable dans ses principaux caractères, ce qui fait qu'on peut le considérer comme un type spécifique, bien nettement différencié, le *B. Coli* au contraire, par la variabilité de ses propriétés, paraît être un centre microbien d'où rayonnent dans diverses directions des types plus ou moins aberrants, qu'une étude isolée peut faire considérer comme des espèces distinctes, mais qui peuvent aussi être ramenés à leur centre d'origine par une étude comparative approfondie, de manière à constituer un groupe assez naturel.

A tous ces microbes présentant l'ensemble des attributs du *B. Coli*, mais se séparant de l'espèce type par un ou deux caractères essentiels, on donne généralement le nom de *Para B. Coli*, d'après Gilbert et Lion (1). Les types les plus répandus sont les suivants : 1° type immobile; 2° type ne donnant pas d'indol; 3° type immobile et ne donnant pas d'indol; 4° type ne réduisant pas le rouge neutre; 5° type ne faisant pas fermenter le lactose.

Pour ces espèces, les vraies bases de classification résident dans leurs caractères microscopiques et dans leurs caractères de culture, bien que les réactions culturales puissent être encore assez souvent atypiques à certains égards.

Les assez nombreux caractères de ressemblance relevés dans son étude, entre ce microbe de l'eau et le *B. Coli*, permettent-ils de le ranger dans ce groupe des *Para B. Coli* ?

Je ne le pense pas, car, par ailleurs, les caractères différentiels sont encore trop fréquents, et certains ont trop d'importance, pour en autoriser l'introduction dans un groupe déjà trop vaste, et qu'il convient de limiter si on ne veut en faire un *caput mortuum* de la microbiologie.

Bien que la variété des formes et des fonctions ne soit pas toujours en contradiction avec l'unité de l'espèce, j'incline néanmoins à considérer ce microbe de l'eau comme un type

(1) Contribution à l'étude des Bactéries intestinales. *Semaine médicale*, p. 130, 1893.

spécial, *non pathogène*, nettement différencié, spécifiquement défini par la propriété qu'il possède de *déshydrater* la glycérine, caractère fondamental qui doit servir de base à sa classification.

APPLICATION DE CETTE ÉTUDE A L'ANALYSE DES EAUX

Si le *B. Coli* existe fréquemment dans l'eau, celui que j'ai étudié en est un hôte plus banal encore : aussi le rencontre-t-on assez couramment dans la pratique de l'analyse bactériologique des eaux.

Dans la partie qualitative de cette analyse, en vue de l'identification des germes, on observe souvent un Bacille *ayant une morphologie semblable à la sienne*; *comme lui, plus ou moins mobile*; *se décolorant plus ou moins facilement par la méthode de Gram*; *capable de se développer en bouillon phéniqué à 1 p. 1.000, à la température de 42°*; *ne liquéfiant pas la gélatine et engendrant sur ce milieu des colonies minuscules*; *ne donnant pas d'indol*; *réduisant modérément le rouge neutre*; *coagulant le lait et faisant virer au rouge le lacto-sérum tournesolé, et qui, réensemencé dans le bouillon lactosé, même non carbonaté, y produit un dégagement gazeux d'hydrogène et d'anhydride carbonique* : en un mot, tous les caractères d'un microbe appartenant à celui qui fait l'objet de cette étude, et ne permettant guère de le distinguer d'un *Para B. Coli*, au moins sans plus ample contrôle. Généralement, ce microbe est considéré par les analystes comme un représentant de ce vaste groupe et de la variété *Anindolicus*.

Comme complément d'information, chaque fois qu'il m'a été donné de constater les faits précédents au cours d'une analyse d'eau, il a été extrêmement intéressant pour moi de savoir si le bacille ainsi rencontré était capable, comme celui que j'ai étudié et de même origine, de transformer la glycérine et d'en produire la fermentation acrylique par déshydratation.

Cette question posée m'a conduit à présenter, sous le nom de *glycéro-réaction*, un nouveau caractère différentiel dans l'étude des espèces microbiennes, notamment et surtout celles peuplant les eaux. L'emploi de cette réaction dans la pratique de l'analyse bactériologique de l'eau aura pour résultat, chaque fois

qu'elle sera positive, d'achever de caractériser le microbe observé en l'identifiant à celui de cette étude, tous les autres caractères précités ayant été, eux-mêmes, préalablement vérifiés.

Il convient de remarquer qu'il s'agit ici d'une action *biochimique*, par conséquent fondamentale; de plus exceptionnelle, par sa voie de déshydratation, par conséquent capitale; enfin, au regard de la glycérine, cette fonction physiologique peut paraître *spécifique*, en raison de cette rareté même et des conclusions générales de l'étude comparative, relatives à l'identification de deux êtres microbiens jouissant de cette faculté déshydratante, issus, en apparence de deux milieux différents, le vin et l'eau; mais ayant en réalité une commune origine, l'eau toujours ajoutée au vin en quantité suffisante pour y apporter des germes.

Son introduction dans le domaine de la bactériologie contribuera à reculer encore les limites de la différenciation des espèces microbiennes. Déjà, parmi les méthodes culturales de séparation des Bactéries, l'association d'un antiseptique et d'une température relativement élevée, réalisée dans le procédé de M. Vincent, par culture en bouillon phéniqué à 1 p. 1.000, à la température de 41°5 à 42°, et si couramment utilisée aujourd'hui, a permis de faire une sélection entre les microbes, en écartant un grand nombre d'espèces qui ne peuvent croître dans ces conditions, en particulier les principales espèces liquéfiantes qui détruisent souvent et rapidement les cultures sur plaques. Mais les microbes qui peuvent végéter ainsi sont encore nombreux et parmi eux se trouvent notamment : d'une part, le *B. Coli* et ses variétés; le Bacille *Typhique* et ses congénères, les *Paratyphiques*; d'autre part, les bacilles que j'ai isolés d'un vin amer et de l'eau.

Si, pour ces microbes relativement résistants, l'association de l'antiseptique et de la température constitue ce que nous pouvons appeler un *réactif général* les classant tous, et à ce point de vue, dans le même groupe, la *glycéro-réaction*, *négative* pour les premiers, *positive* pour les seconds, interviendra vis-à-vis d'eux comme un *réactif secondaire* achevant de les différencier, au moins en permettant de les classer par dichotomie en deux sous-groupes.

Cette réaction, lorsqu'elle sera *positive*, aura ainsi l'avantage, à mon avis, basé sur ce fait que le *Bacillus coli communis*, au moins représenté par les variétés de ce genre qui ont servi à mes expériences, ne jouit pas de la propriété de déshydrater la glycérine, d'éviter le classement d'un microbe d'allures semblables aux siennes, mais possédant cette faculté de soustraction d'eau, dans le groupe déjà si vaste des *Para B. Coli*, lequel sert trop souvent de refuge à notre ignorance.

Selon mes conclusions précédemment formulées, elle permettra, en outre, tous les caractères précités étant vérifiés et satisfaits, de *nommer* le microbe ainsi rencontré en l'identifiant avec le *Bacillus amaracrylus*, sinon l'espèce type, au moins une variété.

GLYCÉRO-RÉACTION

Ce moyen de diagnose bactérienne repose sur la propriété que possède un microbe comme celui que j'ai isolé, soit d'un vin amer, soit de l'eau, de *produire la fermentation de la glycérine en donnant naissance à de l'acroléine.*

Sa mise en œuvre nécessite un milieu de culture glycériné et un réactif permettant de reconnaître facilement le produit de déshydratation de cette substance.

Milieux de culture. — On prépare en provision les deux milieux liquides de composition suivante :

	I	II
	—	—
Sulfate d'ammoniaque	4 gr. 70	4 gr. 70
Phosphate monopotassique .	0 gr. 75	0 gr. 75
Sulfate de magnésie	0 gr. 10	0 gr. 10
Peptone	Néant	3 grammes
Glycérine.	20 grammes	20 grammes
Eau ordinaire	1 litre	1 litre

le second s'obtenant avec le premier, par simple addition de peptone.

On en remplit aux deux tiers des flacons d'environ un dixième de litre de capacité, bouchant à l'émeri : on obture avec du coton, le bouchon étant repéré avec le flacon ou attaché à son goulot et ne devant servir pour la fermeture qu'après l'ensemencement ; conjointement, on répartit les mêmes

liquides dans de petits ballons, pour le remplissage des flacons après stérilisation et au moment du besoin : on chauffe à l'autoclave à 120° pendant 15 à 20 minutes, on laisse les liquides se refroidir et s'aérer à nouveau.

Réactifs. — L'acroléine est décelée par le réactif *protéique acide*, solution d'albumine dans l'acide chlorhydrique nitreux, dont la préparation nécessite les deux solutions suivantes :

Acide chlorhydrique nitreux. — On ajoute à 200 cent. cubes d'acide chlorhydrique pur et concentré (d = 1,18), 1/10 de cent. cube d'une solution d'azotite de potasse pur à 3 gr. 6 p. 100.

Eau albumineuse. — A un blanc d'œuf, on ajoute 5 à 7 cent. cubes d'eau distillée et l'on bat énergiquement; on filtre sur une toile en exprimant : on obtient ainsi une solution d'albumine à 10 p. 100 environ.

Conjointement, mais simplement pour reconnaître rapidement la formation d'un corps à fonction aldéhydique, on peut utiliser le réactif de Schiff, au bisulfite de rosaniline : son emploi est même avantageux et doit logiquement précéder celui du réactif *protéique acide*.

La formule suivante, due à Leys, donne un réactif très sensible, mais assez long à se décolorer.

Solution aqueuse de fuchsine à 1 gramme par litre .	1.000	cent. cubes
Bisulfite de soude à 30° Baumé	10	—
Acide chlorhydrique pur et concentré	10	—

On verse le bisulfite dans la solution de fuchsine, et quand une forte atténuation de la coloration s'est produite, on ajoute l'acide : le liquide prend une teinte brunâtre et au bout de quelques jours devient complètement incolore.

Il est à remarquer que ce réactif donne une coloration rose plus ou moins accentuée avec la plupart des peptones en solution; coloration vraisemblablement due à la présence dans ce complexe protéique d'une trace d'un corps à fonction aldéhydique, comme la glucosamine : mais après quelques jours de culture, le microbe l'ayant consommé, la coloration ne se produit plus. Le milieu peptoné, à concentration faible, ne la donne pas, même avant culture.

Recherche de l'acroléine. — Pour reconnaître l'acroléine dans le liquide de fermentation, il suffit de mesurer successivement dans une petite éprouvette graduée 5 cent. cubes de liquide, 1 cent. cube d'eau albumineuse, puis trois volumes, c'est-à-dire 18 cent. cubes d'acide chlorhydrique nitreux; après

agitation pour redissoudre l'albumine coagulée, le mélange est versé dans un tube à essai pour être placé au bain-marie à 50° : en quelques minutes, il se développe une coloration d'abord *verte*, conservant cette teinte, si la richesse du liquide en acroléine est égale ou supérieure à 1/5.000, et devenant *bleue* ensuite, si la richesse est inférieure à ce titre.

Pour des proportions infinitésimales d'acroléine, on accroît encore la sensibilité de la réaction en employant de l'acide chlorhydrique moitié moins nitreux, et en réduisant également de moitié, c'est-à-dire à 1/2 cent. cube la quantité d'eau albumineuse. En mettant ainsi en rapport, en concordance quantitative, les trois substances fondamentales de la réaction colorée : *aldéhyde acrylique, acide azoteux, albumine* ou mieux *tryptophane* résultant de la dissociation de sa molécule par l'acide chlorhydrique, on évite : d'une part, l'action nuisible de l'acide azoteux, oxydant dont un excès peut détruire la coloration qu'il a primitivement contribué à former; d'autre part, la production d'une légère coloration violacée résultant de l'action de l'acide chlorhydrique concentré sur l'albumine en solution elle-même suffisamment riche, et qui peut rendre moins nette la coloration recherchée.

Dans tous mes essais, la production de l'acroléine a toujours été suffisante pour permettre sa reconnaissance à l'aide du réactif à sa concentration première.

Enfin, pour constater la formation primitive de la teinte verte, lorsque la teinte bleue doit lui succéder, il est utile d'examiner le liquide de la réaction suivant l'axe du tube et sur fond blanc.

Nous allons nous placer dans le cas d'une analyse d'eau et supposer que l'opérateur en est à la recherche du *B. Coli* effectuée suivant la méthode de M. Vincent par ensemencement dans du bouillon de peptone phéniqué, de l'eau examinée, à des dilutions diverses, mais de progression régulière en vue d'une numération, et maintien des milieux de culture à la température de 42°.

Du premier liquide qui s'est troublé, et en suivant la technique de la méthode, c'est-à-dire après un deuxième et au besoin un troisième passage en bouillon de peptone phéniqué et nouveau maintien à l'étuve à 42°, puis repiquage sur bouillon simple, à 37°, et enfin réensemencement de cette dernière culture sur plaques de gélatine, on isole des colonies d'un microbe qui, au point de vue morphologique, biologique et biochimique, notamment par sa culture dans le lait, dans le petit lait tournesolé et le bouillon lactosé, dans le bouillon au rouge neutre, dans l'eau peptonée, possède les caractères généraux mentionnés au début de cette application à l'analyse des eaux.

Ce microbe, *ne donnant pas d'indol*, n'est pas le *B. Coli*

normal. Par ses traits de ressemblance avec lui, en particulier par son caractère de *ferment lactique*, mérite-t-il d'être rangé dans le groupe des *Para B. Coli*? La *glycéro-réaction* doit répondre à cette question en disant : *oui*, si elle est *négative*; *non*, si elle est *positive*; et, dans ce dernier cas, en achevant de l'identifier avec le *Bacillus amaracrylus*.

MODE OPÉRATOIRE

A l'aide d'un prélèvement dans la culture en bouillon lactosé on ensemence, par une goutte, chacun des deux milieux glycérinés : les deux flacons, remplis chacun avec le liquide correspondant d'un ballon et fermés avec leur bouchon, sont laissés à une température voisine de 20°; par exemple, sur la même table du laboratoire en été, ou au voisinage d'un poêle en hiver. Il n'est pas nécessaire que cette température soit invariable; elle peut descendre à 15° ou même au-dessous, pendant la nuit.

Première phase. — Fermentation en milieu acide.

Lorsque le microbe est capable de produire la *glycéro-réaction*, on reconnaît son développement avant 48 heures, et malgré la température relativement basse, dans le milieu peptoné qui devient trouble et entre déjà en effervescence au bout de ce temps. On constate également, mais avec un retard d'environ 24 heures sur les précédents, les mêmes phénomènes de culture et de réaction dans le milieu minéral, lesquels, et notamment le dégagement gazeux, sont en outre moins accentués que dans le milieu peptoné.

A partir de l'apparition de ces phénomènes, c'est-à-dire vers le troisième et le quatrième jour, il convient de suivre, matin et soir, les modifications chimiques survenues dans chacune des cultures, à l'aide du réactif de Schiff, en vue de révéler la présence de la fonction aldéhyde. A cet effet, on prélève dans un tube à essai environ 5 cent. cubes de liquide auquel on ajoute moitié de son volume du réactif : on mélange, et on examine sur fond blanc, à diverses reprises, pendant un quart d'heure; le développement de la coloration n'étant que progressif.

Très souvent, au cours de cette première phase, le réactif de Schiff n'accuse pas la présence d'un aldéhyde dans le milieu peptoné, ou bien la recoloration n'est que légèrement rose. Généralement, l'existence d'un aldéhyde est révélée dans le milieu minéral, au début du quatrième jour.

Dès que sa présence a été reconnue, on suit ses variations de 6 heures en 6 heures à l'aide du réactif : on constate que sa proportion va en croissant, passe par un maximum, à l'époque duquel la recoloration de la fuchsine est souvent intense, puis décroît ensuite progressivement et assez rapidement jusqu'à disparition complète, au moins dans le milieu peptoné. En soumettant parallèlement le liquide à l'essai par le réactif *protéique acide*, on y met en évidence l'acroléine par la formation d'une coloration, bleue, vert-bleuâtre, ou même verte lorsque sa proportion au moment de l'essai est relativement notable et voisine du maximum de cet antiseptique compatible avec la vie du ferment.

Deuxième phase. — Fermentation en milieu neutre.

Lorsque, surtout par suite de l'acidité née dans la liqueur, la fermentation s'est arrêtée, que l'effervescence a cessé, et que l'aldéhyde acrylique primitivement formé a disparu, en totalité ou en partie, en subissant ses métamorphoses variées d'ordre chimique et biochimique, ce qui n'arrive généralement, pour le milieu minéral, que vers le septième jour de l'expérience, on ajoute dans chaque milieu, à ce moment seulement, c'est-à-dire après la *durée d'une semaine* pour la première phase, environ 1 gramme de carbonate de chaux préalablement stérilisé par chauffage dans un petit tube à essai : on agite vivement pour produire la neutralisation et on soumet à nouveau les deux milieux aux conditions de culture précédentes.

La fermentation de la glycérine non transformée recommence alors ; on la suit de 6 heures en 6 heures avec le réactif de Schiff en opérant comme précédemment. On obtient ainsi, généralement en moins de 24 heures, quelquefois dès le premier essai, la recoloration de la fuchsine, même avec la culture en milieu peptoné : habituellement, la coloration rouge violet est déjà très accentuée au bout de 24 heures avec l'une et l'autre culture, et peut être reproduite pendant plusieurs jours, quelquefois plusieurs semaines. Pendant cette période, et de préférence au moment où on juge qu'elle a atteint son intensité maxima, le liquide traité par le réactif *protéique acide* accuse à nouveau la présence de l'acroléine.

Observations.

I. — Ordinairement, j'ai utilisé seulement le premier milieu, purement minéral et glycériné, qui permet de reconnaître la formation de l'aldéhyde acrylique dès la première phase de la fermentation, en milieu acide.

Lorsque, dans ces conditions de moindre alimentation, où il ne reçoit comme azote que de l'azote minéral, le microbe observé satisfait à la *glycéro-réaction*, cette faculté contribue encore à l'identifier avec le *Bacillus amaracrylus*, de même origine.

Le milieu peptoné est moins avantageux ou plutôt moins expéditif, car, au cours de cette première phase, et en raison de l'activité physiologique plus grande du microbe, résultant d'une nutrition meilleure, les métamorphoses biochimiques de l'acroléine formée y sont aussi beaucoup plus rapides ; en sorte que la production de cette *substance révélatrice de la glycéro-réaction* peut passer inaperçue.

Cependant, dans la seconde phase de la fermentation, ce milieu intervient très efficacement pour montrer aussi la for-

mation de l'acroléine dont la révélation par les réactifs est d'autant plus nette que l'addition de l'agent de neutralisation a été faite à un moment plus opportun. En particulier, et bien que la fermentation initiale dans ce milieu s'arrête dès le quatrième ou cinquième jour de culture, il convient de ne réaliser la seconde phase qu'au début de la deuxième semaine de l'expérience : on obtient ainsi, généralement, dès le deuxième jour de la reprise du travail fermentaire, une richesse relativement grande et relativement persistante du liquide en aldéhyde acrylique, avec recoloration violette intense de la fuchsine et coloration verte par le réactif *protéique acide*.

Ajoutons que ces conditions d'exécution de cette seconde phase de fermentation effectuée dans un milieu encore suffisamment nutritif, mais alimentant un être à vitalité amoindrie par son séjour en milieu acide, sont d'ailleurs comparables à celles réalisées primitivement dans le milieu de disette purement minéral.

En un mot, le milieu minéral résout le problème aussi bien dans l'un des modes de fermentation que dans l'autre : le milieu peptoné fournit sa réponse la plus probante dans la phase de fermentation en liqueur neutre succédant en temps opportun à celle en liqueur acide.

Pratiquement, si ce milieu minéral suffit à révéler la *glycéro-réaction*, théoriquement, chacun d'eux est utile pour montrer dans la fonction physiologique du ferment à l'égard de la glycérine, l'existence de la double faculté de *formation* et de *destruction* de son produit de déshydratation, l'acroléine : faculté double dont la constatation met aussitôt en relief l'importance du rôle joué par l'aldéhyde acrylique dans cette transformation biologique de la glycérine.

En suivant attentivement ces expériences de fermentation, réactifs en main, comme je l'ai fait des centaines de fois, on reconnaît : que ces deux propriétés antagonistes se font *presque équilibre* dans un milieu peptoné neuf, acide ou neutre; que la faculté de *formation* est *supérieure* à celle de *destruction* au début de ce même travail, effectué en milieu neutre par le microbe préalablement et suffisamment affaibli par son séjour dans un milieu peptoné ancien au contact des acides qu'il a engendrés, et aussi, lorsqu'on lui impose primitivement, ou

secondairement après neutralisation, de végéter dans un milieu de relative souffrance, comme le milieu minéral glycériné qui, en raison de sa plus prompte réponse, demeure ainsi *celui de choix pour l'essai de la glycéro-réaction.*

J'ajoute que j'ai observé maintes fois la manifestation de ces propriétés successives et opposées dans l'étude de la fonction physiologique du *Bacillus amaracrylus*, d'un vin amer, à l'égard de la glycérine : leur reproduction au cours de l'étude d'un microbe des eaux, à caractères semblables, contribuera encore à l'identifier avec cette espèce.

Si, pour les raisons précédentes, j'accorde la préférence au milieu minéral glycériné, c'est également pour stabiliser en quelque sorte l'acroléine, pour rendre plus favorables les conditions de sa visibilité, que j'ai choisi comme *optima*, après vérifications comparatives, une température de culture relativement basse, moins propre aux manifestations chimiques et biologiques destructives, cependant suffisante pour assurer la production fermentaire de l'acroléine, et afin de préserver autant que possible cet aldéhyde particulièrement fragile contre ses trois principaux ennemis, dans les circonstances actuelles : l'eau, les acides et le microbe.

II. — En étudiant l'action du *Bacillus amaracrylus* sur la glycérine, j'ai reconnu que sa formation de l'acroléine était précédée de celle d'un autre aldéhyde que j'ai qualifié, expérimentalement et déductivement, comme étant le *propanolal 1,3* ou aldéhyde *hydracrylique*, produit intermédiaire de déshydratation entre la glycérine et l'aldéhyde acrylique. Très souvent, au cours de mes essais, j'ai eu l'occasion d'observer la même production intérimaire de la part d'un microbe rencontré au cours d'une analyse d'eau et satisfaisant à la *glycéro-réaction.* Cette reconnaissance a lieu même avec la culture en milieu minéral, lorsque le liquide ne communique au bisulfite de rosaniline qu'une coloration rose : si, à ce moment, on effectue l'essai avec le réactif *protéique acide*, on obtient habituellement une coloration rouge groseille ou rose violacé, analogue à celle que donne l'aldéhyde hydracrylique en solutions très diluées, complètement distincte de la coloration bleue que fournit l'acroléine dans les mêmes conditions. Le réactif

de Schiff, lui-même, annonce cette distinction par la différence de ses colorations : avec la nuance rose dominante pour l'aldéhyde hydracrylique, violette pour l'aldéhyde acrylique.

Cette reconnaissance de la déshydratation progressive de la glycérine par un microbe isolé d'une eau, et de caractères semblables à ceux du *Bacillus amaracrylus*, achèvera de l'identifier avec cette espèce.

En résumé, lorsque la *glycéro-réaction est positive*, son exécution attentivement suivie permet de reconnaître, dans les détails de sa manifestation, plusieurs points fondamentaux de ressemblance avec ceux fournis dans les mêmes circonstances par le *Bacillus amaracrylus*. A elle seule, elle attribue ainsi au microbe observé tout un faisceau de caractères de similitude qui, joints aux autres déjà nombreux et au fait d'une origine commune, autorisent à l'identifier avec cette espèce. En raison de sa rareté, au moins à l'heure actuelle, et jusqu'à la découverte d'un nouvel être jouissant de cette propriété, elle suffirait même à cette identification.

Dans la presque totalité de mes multiples essais de ce genre, expérimentés au cours d'analyses d'eaux, la *glycéro-réaction a été positive* : le microbe observé était bien le *Bacillus amaracrylus*, en espèce ou en variété. Ces résultats de la pratique de l'analyse bactériologique des eaux confirment, par une enquête, sinon plus minutieuse, au moins d'un autre genre, et qui fait ressortir son intérêt à la fois théorique et pratique, mon opinion exprimée dès le début de mon précédent mémoire, par cette phrase : « *La présence dans l'eau, d'un ferment figuré capable de déshydrater la glycérine, paraît générale.* »

III. — A la suite de ces résultats et de leur conclusion se pose immédiatement cette question : Si le *Bacillus amaracrylus* est une bactérie banale, contenue dans toutes les eaux, et de plus capable de végéter dans les bouillons phéniqués à température relativement élevée, selon les conditions numériques imposées par la méthode de M. Vincent, et si en fait on l'isole assez fréquemment en suivant cette méthode, au cours d'une analyse d'eau, comment se fait-il que cette opération, ainsi conduite, ne révèle pas toujours sa présence?

Pour répondre à cette question, il convient de rappeler les faits suivants :

1° La méthode de recherche du *B. Coli*, par essai de culture en bouillon phéniqué à température relativement haute, est avant tout une méthode de séparation, de différenciation microbienne, fondée sur ce fait d'observation que le *B. Coli* est, parmi les microbes suffisamment résistants pour pouvoir végéter dans un tel milieu de souffrance, celui qui y pullule le plus rapidement, en général.

Cette méthode est *éliminatoire* à la fois par l'*antiseptique*, par la *température* et par la *durée* de l'essai ; celle-ci est très variable suivant les expérimentateurs et s'étend généralement de 15 à 48 heures. A l'expiration du délai adopté, lorsque l'examen des cultures ne révèle pas un trouble net et uniforme, on conclut à l'absence de *B. Coli*, et on considère comme terminée cette partie de l'analyse : dans le cas contraire le trouble peut être dû à du *B. Coli*, mais aussi à quelque autre microbe, et notamment notre *Bacillus amaracrylus* : c'est alors qu'interviennent les réactions secondaires différentielles, telles que la recherche du pouvoir indologène ; les caractères de culture en bouillon lactosé ; en bouillon au rouge neutre ; et c'est alors que pourra intervenir aussi et désormais la *glycéro-réaction*.

2° L'eau représente, pour le moins, un *milieu de conservation* assez favorable de la plupart des bactéries qu'elle renferme. Une eau relativement riche en matières organiques, en matières minérales azotées, notamment en nitrates toujours présents, et qui sont à la fois source d'azote et d'oxygène, peut même devenir un véritable *milieu de culture* pour ses bactéries. Dans ce milieu, comme dans toute culture, un même microbe est représenté par des individus de tous âges, appartenant à des générations différentes et comme tels inégalement résistants : transplanté dans un autre milieu, même dans une autre eau, il exigera avant son développement une période d'adaptation ou d'accoutumance plus ou moins longue ; parfois même, il lui arrivera de succomber, surtout si son nouvel habitat lui est hostile, à la fois par l'*antiseptique* et par la *température*, comme l'est, à 42°, le bouillon phéniqué.

Enfin, l'eau dans sa masse, surtout à l'état statique, ne présente une homogénéité, ni chimique, ni biologique : une même espèce microbienne peut s'y trouver très inégalement répartie, à tel point qu'en pratique analytique, et précisément dans la recherche actuelle du *B. Coli*, on observe souvent des résultats en apparence anormaux. Il arrive en effet, au cours de cet essai, que certains liquides de culture se troublent, alors que d'autres, cependant ensemencés avec des quantités d'eau plus grandes, restent limpides : ce fait, assez fréquent, s'observe en général avec des eaux où le *B. Coli* est suffisamment rare, pour que certaines prises d'ensemencement, même volumineuses, puissent être privées du microbe, disséminé, au contraire, dans d'autres plus petites.

Pour ces raisons principales, tenant : au pouvoir antiseptique et à la température du milieu ; à la durée limitée de l'essai ; à la pullulation admise comme relativement plus rapide du *B. Coli*, spécialement visé ; à la valeur vitale et conséquemment reproductive des éléments microbiens d'une eau en relation directe avec son pouvoir nutritif, entraînant avec elle une période plus ou moins longue d'adaptation nécessitée par le changement de milieu ; et à la dissémination plus ou moins rare, jamais uniforme, d'une espèce quelconque dans ce liquide, il doit s'ensuivre que cette méthode de triage des espèces microbiennes d'une eau, spécialement adaptée à la recherche du *B. Coli*, peut très bien ne pas dévoiler la présence du *Bacillus amaracrylus*, lequel, par contre, lorsqu'il se présentera au milieu phéniqué avec une vitalité suffisante, nécessitant une accoutumance moindre, pourra donner un trouble net, en l'absence du premier et dans le minimum de temps imparti à son développement, quelquefois en un temps plus court.

Ces considérations permettent d'aller plus loin en émettant l'opinion que, sans culture préalable, c'est-à-dire telle qu'on la pratique d'habitude, et même avec le maximum de durée de 48 heures, cette méthode, assurément très utile, peut ne pas révéler le *B. Coli* dans une eau contenant ses représentants en minime quantité et dans un état de mauvaise conservation, d'affaiblissement tel que tous devront fatalement succomber à

leur arrivée dans le milieu phéniqué, si, pour eux tous, son pouvoir bactéricide l'emporte sur son pouvoir alimentaire.

En d'autres termes, alors que nos milieux glycérinés, peptoné ou même purement minéral, sont très propres à nous déceler l'existence du *Bacillus amaracrylus* dans une eau qui les a ensemencés, en donnant des cultures prospères de ce microbe permettant d'assurer ensuite son développement dans le bouillon phéniqué, à 42°, généralement même en moins de 15 heures; au contraire, l'ensemencement direct de l'eau dans ce dernier milieu devra être parfois impuissant à procurer cette multiplication, même après une durée de 48 heures.

La pratique de la culture avec durée indéterminée, dans nos milieux ordinaires, comme le milieu peptoné, réalisable avec plus ou moins de rapidité et de vigueur par la généralité des microbes, constitue en quelque sorte une *épreuve d'examen*, à laquelle tous peuvent être candidats; tandis que la tentative de culture avec délai, dans le milieu phéniqué, à 42°, doit être considérée comme une *épreuve de concours* où les chances, limitées à la fois par la difficulté et par le temps, ne peuvent assurer le succès qu'à certains d'entre eux, choisis parmi les plus forts et les mieux adaptés à l'épreuve : pour répondre à notre désir, et s'il était possible, elles ne devraient même l'assurer qu'à un seul, le *B. Coli*.

Il ne faut jamais oublier, enfin, que si, en bactériologie, les résultats positifs permettent une affirmation absolue, sans restriction aucune, ceux qui sont négatifs ne peuvent qu'autoriser le doute et n'ont, par eux-mêmes, aucune signification.

Cette longue parenthèse étant fermée, avant de clore aussi la discussion qui l'a précédée, et malgré la préférence que j'y ai témoignée au milieu minéral, j'estime qu'il convient de réaliser *toujours en double*, l'essai de la *glycéro-réaction*, en étudiant parallèlement le travail microbien en milieu peptoné et en milieu minéral. Même dans cette application à l'analyse des eaux, à plus forte raison en dehors d'elle, et indépendamment d'avantages précédemment mentionnés, plus spécialement propres à ce milieu peptoné, il peut se présenter une bactérie, venant de l'eau ou ayant une autre origine, qui jouisse, elle aussi, de la propriété de déshydrater la glycérine,

mais sans pouvoir végéter dans un milieu de relative disette, comme l'est notre milieu minéral : la culture en liquide peptoné interviendra alors utilement pour dénoncer à la fois son existence et sa faculté de déshydratation de la glycérine.

* * *

EXPLICATION ET COMPARAISON DES PHÉNOMÈNES SUCCESSIFS DE LA *GLYCÉRO-RÉACTION* PRODUITS PAR LE *BACILLUS AMARACRYLUS* ORIGINAIRE DE SON MILIEU NATUREL, L'EAU, OU VENANT D'UNE CULTURE ARTIFICIELLE

Lorsqu'on prépare le milieu de culture peptoné et glycériné avec de l'eau ordinaire et qu'on ne stérilise pas, la *glycéro-réaction* due au *Bacillus amaracrylus* normalement présent dans l'eau est généralement *positive* dans la phase de fermentation en milieu acide.

Lorsqu'on prélève ce bacille dans l'une de ses cultures, le renfermant à l'état adulte et en bonnes conditions de vitalité, par exemple dans le milieu précédent, ou en bouillon lactosé, et qu'on l'ensemence dans le même milieu peptoné et glycériné, préparé avec la même eau, mais stérilisé, à nouveau aéré par abandon prolongé ou agitation en flacon seulement obturé par du coton, la *glycéro-réaction* est généralement *négative*, dans la phase de fermentation en milieu acide.

Au contraire, lorsqu'on emploie le milieu de culture glycériné purement minéral, la *glycéro-réaction* est *positive* dans cette première phase, aussi bien avec le microbe considéré à l'état sauvage qu'avec le microbe cultivé.

Il y a lieu de chercher et de donner une explication de cette divergence et de cette concordance, en conformité avec les faits expérimentalement observés.

I. — Lorsque le ferment apporté par l'eau est ensemencé dans un liquide glycériné peptoné ou purement minéral, il passe dans un milieu plus favorable à son développement et sa *vie ralentie* devient *vie active*. Les transformations successives

par déshydratation qu'il fait subir à la glycérine, telles qu'elles nous sont révélées par les réactifs chimiques, apparaissent en quelque sorte comme parallèles aux diverses phases de son évolution. Au début de son développement, son activité fermentaire et par suite son pouvoir déshydratant sont *minima* ; il engendre alors surtout de l'aldéhyde *hydracrylique* : puis, son fonctionnement vital et conséquemment son *activité déshydratante* croissant régulièrement, il complète au cours de cette nouvelle phase évolutive la soustraction d'eau en donnant naissaissance à l'aldéhyde *acrylique*, dont la proportion dans le liquide, toutes conditions de vie, de composition de milieu, et de température étant dans leur ensemble le plus favorables à cette formation, atteint un *maximum* révélable par le réactif *protéique acide*, et pouvant même être prévu par les seuls réactifs organoleptiques des muqueuses nasale et lacrymale.

Mais cet état de maximum ne dure pas longtemps, surtout dans le milieu peptoné, où le réactif albumineux acide accuse bientôt la disparition graduelle, devenant généralement totale, de l'acroléine. C'est qu'en effet, aux conditions précédentes de bonne nutrition, de vie particulièrement active, en succèdent d'autres de moins en moins favorables à la vitalité et par conséquent à l'activité du ferment : le milieu lui devient en quelque sorte graduellement hostile par les acides formés, et vraisemblablement surtout par l'acroléine elle-même qu'il a engendrée et dont il entreprend immédiatement la destruction pour la transformer en produits moins nuisibles. En d'autres termes, la *période de formation* est suivie, dans le cas actuel où elle est réalisable, de la *période obligée de destruction* de la substance chimique paralysante qui doit posséder vis-à-vis du microbe, le plus grand pouvoir antiseptique ou coagulant, et qui est la plus facile à transformer en raison de la plasticité de sa molécule due à la fonction aldéhyde : *l'action productive* d'acroléine, d'abord prépondérante, se trouve ainsi *bientôt en équilibre* avec l'*action destructive*.

A ce sujet, il convient d'affirmer qu'il ne s'agit pas là d'une simple hypothèse : mais que cette explication relative à la disparition constatée de l'aldéhyde acrylique résulte logiquement d'un fait palpable, révélé par l'expérience directe, laquelle montre que le bacille jouissant de la faculté de déshydrater la

glycérine, est aussi capable de transformer l'acroléine d'origine *purement chimique*, directement ajoutée dans un milieu de culture favorable à son développement. Cette faculté d'un microbe de modifier à son gré en le reprenant en sous-œuvre, un composé chimique primitivement élaboré par lui, n'est d'ailleurs pas isolée dans le cadre des divers travaux accomplis par les cellules vivantes, dont l'ensemble pour chacune d'elles est toujours le résultat de l'analyse et de la synthèse. Le cas actuel est plus particulièrement intéressant, car il nous fait voir l'*antiseptique* pouvant jouer le rôle d'*aliment*.

L'action destructive exercée sur l'acroléine n'est pas seulement d'origine biologique; elle se complète aussi par voie purement chimique, en raison de l'instabilité de cet aldéhyde, surtout à l'*état naissant*, en présence de l'eau, des acides et même des composés salins du milieu, notamment du sel ammoniacal. C'est en raison de ces deux actions destructives fondamentales, d'ordre *biologique* et *chimique*, dont la première prime la seconde, au moins quand elles agissent sur de l'acroléine à l'*état libre*, que son existence est si éphémère, surtout en milieu peptoné, dans lequel, sauf pendant un temps relativement court où sa proportion peut atteindre un maximum qui permet de la révéler très nettement, elle ne fait en général qu'apparaître pour s'évanouir presque aussitôt. Dans le milieu minéral, où la fermentation est plus lente, en raison du développement microbien moins rapide, résultant d'une nutrition moins favorable, l'existence de cet aldéhyde est plus durable parce que la *vitesse de sa formation* l'emporte pendant plus longtemps sur la *vitesse de sa destruction*.

Dans chacun des deux milieux, lorsque la quantité des acides formés est suffisante, le microbe se trouve paralysé dans sa vitalité et conséquemment dans son *activité déshydratante* qui redevient *minima*, comme au début de la fermentation, mais pour une *cause différente* : c'est alors qu'apparaît à nouveau l'aldéhyde *hydracrylique*, substance que le ferment est impuissant à déshydrater, peut-être même à transformer d'autre façon, et la fermentation s'arrête. Elle reprend aussitôt, dès qu'on neutralise la liqueur par le carbonate de chaux : le microbe, désormais soustrait à l'action des acides, recouvre progressivement son activité déshydratante, et transforme à

nouveau la glycérine résiduelle en acroléine déjà révélable par le réactif *protéique acide*, au bout de quelques heures.

Les phénomènes successifs de *formation* et de *destruction* observés au cours de ces deux fermentations, elles-mêmes successives, de la glycérine, en milieu acide et en milieu neutre, montrent explicitement le rôle fondamental joué par les deux aldéhydes nés de sa déshydratation, notamment l'acroléine. Ils sont d'ailleurs pleinement conformes à la logique des transformations de la matière se résolvant *graduellement* en éléments plus simples.

II. — Lorsque le ferment venant du bouillon lactosé, ou plus généralement d'un milieu convenablement nutritif, est ensemencé dans un liquide glycériné peptoné, il apporte avec sa vitalité parfaite, son maximum d'*activité fermentaire*, dans ce nouveau milieu très propre à l'entretien de ces qualités. Il décompose presque immédiatement la glycérine, mais sans permettre, au moins dans la plupart des cas, la révélation par les réactifs des deux composés aldéhydiques résultant de sa déshydratation : au fur et à mesure de leur formation, le *propanolal* se trouve transformé en *acroléine*, et celle-ci en ses produits de métamorphose. En d'autres termes, les *vitesses de formation* de ces deux corps intermédiaires, *révélateurs de la glycéro-réaction*, se trouvent généralement *équilibrées* par leurs *vitesses de destruction*, et l'analyse du liquide, à tout moment de la fermentation, n'en montre le plus souvent que les produits ultimes et définitifs.

Au bout de quelques jours, celle-ci s'arrête, en raison de l'influence paralysante exercée par les acides engendrés sur le bacille dont la vitalité et par suite l'*activité fermentaire* se trouvent très notablement amoindries, et d'autant plus que le séjour dans ce milieu de souffrance se prolonge plus longtemps. Si, à ce moment, on vient à neutraliser le liquide par addition de carbonate de chaux, le microbe soustrait à l'action des acides, recouvre graduellement ses qualités *vitale* et *fermentaire*; il reprend sa tâche interrompue et transforme la glycérine résiduelle : mais cette fois, les étapes successives de son travail, au lieu d'être très rapides, presque simultanées, ne sont que progressives et à chaque instant en rapport avec le

rétablissement de ses qualités normales; aussi, pendant un certain temps, variable, les réactifs permettent de mettre en évidence dans le liquide les deux aldéhydes de déshydratation, au moins l'un d'entre eux.

Toutes choses égales d'ailleurs, cette période de visibilité de l'acroléine est plus longue lorsqu'on a laissé plus longtemps le microbe s'affaiblir par contact avec les antiseptiques nés dans la culture : c'est pourquoi, et cette recommandation vise spécialement le milieu peptoné, j'indique dans ce qui précède, de ne commencer cette seconde phase de fermentation en liqueur neutre, qu'après durée d'une semaine environ pour la première phase en liqueur acide. De même cette période s'accroît aussi, lorsqu'on oblige le microbe à réaliser son œuvre fermentaire, en particulier cette seconde phase, à une température relativement basse, de 15° à 20°, comme celle du laboratoire. Ces conditions opératoires m'ont parfois permis de reconnaître, à tout instant, l'acroléine pendant plus de trois semaines.

III. — Lorsque le ferment venant du bouillon lactosé, ou plus généralement d'un milieu convenablement nutritif, est ensemencé dans le liquide glycériné purement minéral, il passe dans un nouveau milieu beaucoup moins favorable à son développement que celui dont il provient. Ses qualités *vitale* et *fermentaire* déclinent rapidement, tout en restant suffisantes pour accomplir la transformation de la glycérine qui s'établit lentement, progressivement, en laissant subsister dans le liquide, pendant un temps suffisant pour leur reconnaissance, les divers matériaux de la dégradation de sa molécule. Aussi, est-il très facile de déceler à l'aide du réactif *protéique acide*, chacun des deux aldéhydes de déshydratation, surtout l'acroléine qui doit servir de témoignage à la *glycéro-réaction*, et dont la *vitesse de formation* l'emporte sur la *vitesse de sa destruction*, généralement au moins pendant 48 heures, dans cette phase de fermentation en milieu acide.

Au bout de quelques jours, le microbe se trouvant paralysé par les acides engendrés, la fermentation s'arrête : elle reprend presque aussitôt après leur neutralisation par le carbonate de chaux, et le réactif albumineux acide montre à nouveau les

étapes successives de la transformation de la glycérine résiduelle dans ce milieu neutre, notamment celle qui aboutit à la production de l'acroléine, dont la proportion et la persistance paraissent d'habitude encore plus accentuées que dans la phase de fermentation primitive en milieu acide, surtout si l'on a eu soin de laisser écouler un temps convenable entre le moment de l'arrêt de celle-ci et de sa reprise après neutralisation, et si la température moyenne est relativement basse, voisine de 15°. Les réactifs peuvent alors déceler l'acroléine, parfois encore un mois après cette reprise.

En résumé, dans la phase de fermentation en milieu peptoné acide, la *divergence* observée dans la qualité fermentaire du *Bacillus amaracrylus* venant directement de son habitat naturel, l'eau, ou d'une culture artificielle, tient à la différence profonde qui existe dans l'état physiologique initial du microbe *sauvage* et du microbe *cultivé*.

Au début de la phase de fermentation en milieu neutre, et grâce à la culture préalable résultant de la période antérieure, cette différence s'est nivelée et le bacille se trouve dans des conditions de valeur *vitale* et *fermentaire* comparables dans chacune des deux expériences.

Avec le milieu glycériné purement minéral, la *concordance* observée dans la qualité fermentaire du *Bacillus amaracrylus* venant directement de l'eau ou d'une culture artificielle tient à ce que le fossé existant entre les deux états physiologiques initiaux du microbe se trouve comblé dès la première phase de fermentation en milieu acide; ces deux états se modifiant rapidement et en sens inverse, chacun d'eux allant en quelque sorte à la rencontre de l'autre, l'un par *croissance*, l'autre par *décroissance* de la valeur *vitale* et *fermentaire*.

Enfin, qu'il s'agisse de milieu convenablement *nutritif* ou de milieu de *disette*, à réaction *acide* ou à réaction *neutre*, le bacille jouissant de la faculté de détruire l'acroléine qu'il a formée, la *glycéro-réaction* n'est pas révélable à tout moment de la fermentation : la période la plus favorable à sa reconnaissance étant celle où la *vitesse de formation* de l'aldéhyde acrylique l'emporte le plus sur la *vitesse de sa destruction*. Dans la phase de fermentation en milieu acide, cette période

n'est pas celle qui commence avec le développement du microbe, où il engendre surtout de l'aldéhyde hydracrylique; elle n'est pas davantage celle qui correspond au maximum de vitalité qu'il est susceptible d'acquérir dans son milieu de travail, car à ce moment le bacille, déjà gêné par elle, éprouve le besoin de transformer l'acroléine au fur et à mesure qu'il la produit : cette période *opportune* correspond à une époque intermédiaire, celle de l'acheminement de l'*état vital moyen* vers l'*état vital relativement parfait*, celle où le milieu se trouve richement peuplé de bacilles en voie de développement.

C'est à ce moment de son évolution que le microbe éprouve les plus grands besoins, que sa vie anaérobie doit s'alimenter le plus au moyen de la *dislocation intérieure* de la glycérine qui est, dans le milieu minéral, le seul aliment organique pouvant lui fournir du carbone. A l'égard de son protoplasma, la *glycérine* se comporte comme une sorte de *corps explosif*, capable de lui fournir de la chaleur en disloquant et en groupant autrement ses éléments, notamment par sa transformation en *eau* et en *acroléine*, suivie de la polymérisation au moins partielle de cet aldéhyde; réactions qui sont *exothermiques*, d'après mes recherches sur les chaleurs de formation de l'acroléine et de la métacroléine (1), fournissant pour cette scission et cette édification moléculaires les traductions thermochimiques suivantes :

$$\underset{\text{Glycérine}}{C^3H^8O^3 \text{ liq.}} = 2\,H^2O \text{ liq.} + \underset{\text{Acroléine}}{C^3H^4O \text{ liq.}} + 3^{Cal},78.$$

$$3\,\underset{\text{Acroléine}}{C^3H^4O \text{ liq.}} = \underset{\text{Métacroléine}}{(C^3H^4O)^3 \text{ sol.}} + 10^{Cal},21.$$

Comme à cette dégradation de la glycérine par déshydratation correspond un dégagement de chaleur relativement faible, si elle joue un rôle principal dans la dislocation, le microbe, pour suffire à son fonctionnement vital, doit transformer suivant cette voie une quantité relativement grande de cette substance, et grande aussi doit nous apparaître à ce moment la puissance de ce microbe comme ferment.

(1) Chaleurs de formation de l'acroléine et de la métacroléine. *Bull. Soc. Chim.*, 4e série, t. XVII, p. 34, 1915, et Thèse de Doctorat ès sciences, *loc. cit.*, p. 269, 1917.

Si donc nous attribuons à la réaction de déshydratation de la glycérine un rôle fondamental dans sa fermentation actuelle, les principes de la thermochimie sont d'accord avec ceux de la physiologie pour montrer que c'est à cette époque de l'adolescence du microbe, celle du plus grand besoin pour le fonctionnement vital, que doit correspondre la plus grande *activité déshydratante*. La pratique expérimentale a toujours confirmé cet aveu de la théorie : seule, elle a pu montrer la *supériorité*, au cours de cette phase évolutive, de la *vitesse de formation* sur la *vitesse de destruction* de l'agent chimique révélateur de la glycéro-réaction.

Dans la phase de transformation en milieu neutre succédant à celle en milieu acide, la période propice à cette révélation commence presque aussitôt après la reprise de la fermentation. Ce milieu se trouve en effet richement peuplé en bacilles, mais dont le fonctionnement vital a plus ou moins souffert par le séjour plus ou moins prolongé au contact des acides engendrés. Soustrait à cette action paralysante, le microbe s'efforce de recouvrer progressivement sa vitalité et y arrive en reprenant activement, mais aussi graduellement, le travail de déshydratation qu'il avait dû abandonner.

L'eau potable glycérinée peut donner la *glycéro-réaction*. Le *Bacillus amaracrylus* consomme l'azote nitreux.

Nous avons vu le *Bacillus amaracrylus* produire la déshydratation de la glycérine par sa culture en milieu, soit peptoné, soit moins nutritif et purement minéral, de composition précédemment donnée. Mieux encore, ce microbe peut évoluer et satisfaire à la *glycéro-réaction*, dans des milieux beaucoup moins alimentaires, en particulier ceux résultant d'une simple addition de glycérine à de l'eau ordinaire, *même potable*, et cela grâce à la faculté générale des êtres inférieurs de se contenter momentanément de petites quantités de substances nutritives, de l'ordre de grandeur des matières organiques et des nitrates toujours présents dans ce liquide.

Les bactéries peuvent vivre et se conserver dans l'eau parce qu'elles y trouvent toujours un peu de matière organique, et

parce que, lorsqu'elles n'en trouvent plus, celles d'entre elles qui meurent servent d'aliment à celles qui subsistent. Une eau relativement riche en matières organiques, en matières minérales azotées, notamment en nitrates, peut même devenir un véritable milieu de culture pour ses bactéries. Il était présumable que l'addition pure et simple de glycérine à une telle eau suffirait à y révéler la présence du bacille, agent de la *glycéro-réaction*.

Ayant reçu un échantillon d'eau de Montchanin pour en faire l'analyse chimique, simplement au point de vue de la potabilité, analyse dont voici les résultats comparatifs avec ceux de l'eau de Dijon à la même époque :

	EAU de Montchanin	EAU de Dijon
Degré hydrotimétrique total. . . .	22	22
Ammoniaque et sels ammoniacaux.	Néant.	Néant.
Nitrites	Traces.	Néant.
Nitrates, en N^2O^5, par litre	10 mgr. 55	3 mgr. 02
Chlorures, en Cl, par litre	37 mgr. 85	3 mgr. 10
Matières organiques par litre . . . (évaluées en oxygène emprunté au permanganate de potasse alcalin).	1 mgr. 125	0 mgr. 250

j'eus l'idée de tenter avec elle une culture directe en y ajoutant de la glycérine, à la dose de 5 grammes par litre, afin de savoir ce que valait, au moins pour cette eau, la présomption précédente.

Le mélange laissé à la température du laboratoire, voisine de 20°, en flacon plein et bouché, devint en quelques jours une culture évidente : au bout de deux semaines, le bisulfite de rosaniline et le réactif *protéique acide* ajoutés, chacun à une prise d'essai du liquide, fournirent des colorations assez intenses, même *verte* avec ce dernier. L'acroléine fut en outre extraite par distillation et rectification, à l'état de solution diluée, et sa présence contrôlée par ses autres réactions, en particulier par ses caractères organoleptiques très manifestes au cours de la distillation.

La même eau glycérinée, mais *stérilisée*, ensemencée avec une culture pure de *Bacillus amaracrylus* donna un résultat identique.

A la suite de cette constatation, il était intéressant de connaître les mutations éprouvées par l'azote alimentaire du

milieu, au moins l'azote à formes minérales, les seules facilement reconnaissables et dosables. L'analyse fournit aussitôt les résultats suivants pour chacune des cultures :

Azote ammoniacal	Néant.
— nitreux	Néant.
— nitrique	Néant.

La totalité de la minime quantité d'azote minéral, nitrique et nitreux, avait donc été transformée par l'être vivant, vraisemblablement assimilée en grande partie par lui en raison de la pénurie alimentaire du milieu, peut-être aussi avec libération de trace d'azote élémentaire, cet être rentrant dans la catégorie des microbes *dénitrifiants indirects*; en tout cas, avec formation intérimaire de nitrite bien accusée en cours de culture; quant au chlore, il avait à peine varié.

Parallèlement, la même épreuve tentée avec l'eau de Dijon, relativement pure en azote minéral comme en matière organique, et qui a servi communément à la préparation des liquides de culture de cette étude, donna un résultat négatif.

Puisque l'eau de Montchanin, de composition précédente, à teneur cependant relativement moyenne en matières organiques ou même en nitrates, et aussi diverses autres eaux de composition analogue, permettent cette culture par ensemencement spontané, grâce surtout au concours alimentaire de ces derniers composés azotés, que les végétaux préfèrent à l'ammoniaque parce qu'ils leur procurent à la fois de l'azote et de l'oxygène, il me parut encore désirable de savoir s'il suffirait, pour obtenir le même résultat cultural et biochimique, de remonter le taux en azote nitrique de l'eau de Dijon, par addition de quelques centigrammes d'azotate de potasse par litre. L'expérience ainsi consultée répondit encore par l'affirmative, quoique avec moins d'intensité que la précédente, accusant néanmoins ainsi et à nouveau : le pouvoir alimentaire dévolu aux nitrates; le pouvoir dénitrifiant du bacille, la culture renfermant des traces de nitrite; sa faculté déshydratante à l'égard de la glycérine, le réactif *protéique acide* révélant la présence de l'acroléine; enfin, l'exquise faculté d'assimilation des infiniments petits, sachant utiliser et adapter à

leurs besoins des quantités très faibles de matière nutritive.

En ce qui concerne le *Bacillus amaracrylus*, on reconnaissait déjà cette sensibilité assimilatrice au cours des épreuves culturales antérieures, en milieu peptoné ou minéral, lesquelles manifestent mieux les propriétés du microbe lorsque les liquides nutritifs ont été préparés avec de l'eau ordinaire constituant son habitat naturel et son milieu nourricier habituel, qu'avec de l'eau distillée, privée de traces de substances minérales à l'utilisation desquelles son protoplasma avait été accoutumé, et dont l'absence ne doit pouvoir être intégralement compensée par l'addition à de l'eau distillée des trois sels minéraux : sulfate d'ammoniaque, phosphate de potasse, sulfate de magnésie. En travail alimentaire, comme en travail fermentaire corrélatif du premier, la vie d'un être vivant constitue un réactif infiniment plus sensible et plus précis que nos réactifs chimiques les plus puissants : la preuve immédiate de ce fait est fournie par cette étude même, où nous voyons, dans ce qui précède comme dans ce qui suit, notre bacille utiliser jusqu'à l'ultime trace d'azote minéral que ne peuvent plus déceler les réactifs cependant ultra-sensibles des formes nitrique et surtout nitreuse de cet élément; dont les uns, comme la solution sulfurique de diphénylamine, le réactif sulfophénique de Grandval et Lajoux, sont communs à ces formes; dont les autres, comme le réactif de Griess, celui de Trommsdorff à l'iodure de zinc amidonné, notamment le premier, appartiennent plus spécialement à l'acide azoteux et aux azotites.

* * *

Alimentation nitreuse. — Pour compléter ces recherches relatives à l'utilisation par ce microbe de traces d'azote minéral, j'ai tenu à m'assurer autrement, par addition directe, et parfois en l'absence de toute autre matière azotée, si les nitrites qui, d'ordinaire, sont considérés, même à doses relativement faibles comme des substances toxiques pour les organismes inférieurs, pouvaient cependant, à dose convenable, lui servir directement de matière alimentaire azotée.

Pour résoudre ce problème, j'ai préparé d'abord quatre milieux de composition suivante :

Phosphate monopotassique	0 gr. 75	Phosphate monopotassique	0 gr. 75
Sulfate de magnésie. . . .	0 gr. 10	Sulfate de magnésie. . . .	0 gr. 10
Nitrite de potasse. 0 gr. 1 et	0 gr. 2	Nitrite ammonique. 0 gr. 1 et	0 gr. 2
Glycérine	2 gr.	Glycérine	2 gr.
Carbonate de chaux. . . .	1 gr.	Carbonate de chaux. . . .	1 gr.
Eau distillée.	1 litre.	Eau distillée	1 litre.

puis quatre autres semblables, le glucose y remplaçant la glycérine comme aliment carboné.

Ces huit milieux stérilisés ont été ensemencés avec une culture pure de *Bacillus amaracrylus* et placés à l'étuve à 37° : en moins de 24 heures, tous deviennent louches et sont le siège d'une culture évidente. Au bout de 5 jours, chacun des réactifs précédents de l'acide azoteux, ainsi que le réactif de Nessler, accusent la disparition totale de l'azote nitreux et ammoniacal dans les cultures à base de nitrite d'ammoniaque et de glucose; ce même délai suffit à la consommation complète de l'acide nitreux dans les cultures glucosées à base de nitrite de potasse; enfin, les mêmes résultats sont observés au bout d'une semaine dans les cultures glycérinées.

Le problème posé est donc bien démontré : le *Bacillus amaracrylus*, alimenté dans nos milieux à base de nitrite de potasse, avec de l'acide nitreux, à l'exclusion de tout autre aliment azoté, se développe bien, en transformant la totalité de l'azote nitreux du milieu nutritif.

L'acide nitreux, terme de passage de l'assimilation des nitrates ou produit intérimaire de fermentation de l'acide nitrique, peut être considéré comme un aliment des végétaux inférieurs, quand il leur est offert à dose convenable.

M. Mazé (1), en alimentant des plantules de maïs avec du nitrite de sodium, sans autre aliment azoté, est arrivé à la même conclusion en ce qui concerne les végétaux supérieurs.

Si nous tenons compte de l'influence paralysante exercée par les nitrites sur la végétation du *Bacillus amaracrylus*, et sachant que la dose *minima* de 10 grammes de nitrite de soude ou de potasse, par litre du milieu peptoné servant à la glycéro-réaction, suffit à arrêter la multiplication cellulaire et la fermentation de la glycérine, les résultats précédents nous révèlent une fois de plus la double faculté *antiseptique* et *alimentaire* d'une

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXV, p. 369-391, 1911.

même substance, en relation avec sa proportion et l'état de disette du milieu nutritif.

Si nous rapprochons et associons la faculté de ce microbe de créer en partie sa substance vivante aux dépens des *nitrates* naturellement contenus dans les eaux, et aussi des *nitrites*, avec sa propriété *dénitrifiante* conduisant intérimairement au stade nitreux, puis à l'azote élémentaire par sa culture en bouillon ordinaire nitraté, nous entrevoyons le rôle qu'il doit jouer parmi le monde à l'état de mutation continue des infiniments petits, peuplant le sol et l'eau, ces deux grands réservoirs de la vie microbienne, par sa contribution dans le cycle de l'évolution de l'azote dans la nature, à la *formation par dénitrification*, et à la *destruction*, soit par *réduction* plus complète, soit par *absorption*, des nitrites dont l'absence ou la présence dans une eau n'est que la résultante d'actions biochimiques incessantes et inverses, *nitrifiantes*, *dénitrifiantes* et *assimilatrices*.

Ajoutons encore que le rôle joué par les matières amidées dans la dénitrification sous l'action de ce bacille doit contribuer, pour une part, dans le bilan des pertes d'azote en agriculture, pertes qui font que le cycle d'évolution de cet élément dans la nature ne peut constituer pratiquement un cycle fermé, et sans qu'il soit nécessaire de les compenser par restitution de matières azotées.

L'acroléine, engendrée par cette action biochimique, résulte bien de la déshydratation de la glycérine.

Dès le début de mes recherches, effectuées d'abord avec le bacille isolé d'un vin amer, j'ai admis, selon toutes vraisemblances, pour la genèse par voie biologique de l'acroléine à partir de la glycérine, son mode classique de formation par voie physique ou chimique aux dépens de cette substance ; au cours de leur développement, cette opinion s'est imposée comme une vérité : à la fin de cette étude, il convient de réunir les faits devant la justifier.

D'abord, à part l'existence d'un composé aldéhydique qualifié comme aldéhyde hydracrylique, je n'ai pu trouver dans

mes cultures un autre corps capable de servir d'intermédiaire entre la glycérine et l'acroléine; de plus, en y substituant à la glycérine divers produits habituels de sa fermentation, en particulier les acides butyrique, lactique et succinique, l'aldéhyde glycérique et la dioxyacétone, le glycol triméthylénique, je n'ai pas reconnu la production de l'aldéhyde acrylique.

D'autre part, une hypothèse de la formation indirecte de cet aldéhyde aux dépens de la glycérine par l'oxydation *extérieure* d'un composé intérimaire serait absolument incompatible avec le phénomène de la *glycéro-réaction*, laquelle fournit d'ailleurs la *preuve expérimentale de la production directe de l'acroléine par soustraction progressive des éléments de deux molécules d'eau à la molécule de la glycérine.*

Chacune des fermentations successives en milieu acide et en milieu neutre, dont l'ensemble constitue les épreuves de cette réaction, s'accomplit en effet en flacon complètement rempli, bouché à l'émeri ou même *hermétiquement clos*, c'est-à-dire en l'absence d'oxygène libre. Il en est ainsi, même pour la première phase fermentaire, car la faible quantité de ce gaz qui existait en dissolution au début a été consommée par le microbe pour son développement et avant la fermentation proprement dite, laquelle crée en outre un milieu réducteur par les gaz dégagés, notamment l'hydrogène naissant. Dans la seconde phase, surtout favorable à la reconnaissance de l'acroléine, et comparable au point de vue de l'anaérobiose à celle qui se passe dans la bouteille de vin malade, non seulement l'oxygène fait complètement défaut dès l'origine, mais dans ce milieu essentiellement réducteur, saturé d'hydrogène et de gaz carbonique, le réactif *protéique acide* révèle, en quelque sorte, la *naissance* de l'acroléine *dès le début* de la reprise de la fermentation de la glycérine subsistant dans le milieu, ou *aussitôt après* l'introduction d'une nouvelle quantité de cette substance.

Ainsi donc, aucune cause d'oxydation *extérieure* ne peut accompagner la formation de l'aldéhyde acrylique au cours de la *glycéro-réaction* dans mes conditions opératoires. Comme dans la vie d'un microbe *anaérobie*, pendant cette phase de la vie anaérobie du bacille agissant sur la glycérine ou sur cha-

cune des autres substances fermentescibles, l'oxydation demeure *intérieure* et doit s'effectuer souvent au moyen de l'oxygène de l'eau conformément à la propriété reconnue aux microbes anaérobies de pouvoir décomposer ce corps, et ainsi que j'ai été conduit à l'admettre moi-même pour l'explication de certains des résultats de mes fermentations.

La déshydratation bactérienne de la glycérine conduisant à l'acroléine correspond à la combustion de la moitié de l'hydrogène de sa molécule; et il s'agit ici, non pas d'une combustion *intérieure* surérogatoire nécessitant le concours de l'oxygène d'une autre molécule particulièrement stable, comme celle de l'eau, mais d'une combustion *intérieure* propre, c'est-à-dire qu'elle se fait aux dépens de l'oxygène même de la substance. En d'autres termes, ce phénomène serait pour le *Bacillus amaracrylus* et à l'égard de l'hydrogène de la glycérine, analogue à la combustion *interne* par la levure d'une partie du carbone du sucre dans le phénomène de la fermentation alcoolique.

En examinant les faits suivants établis par mes expériences et mes résultats de fermentation : genèse rapide, initiale, de l'acroléine; production intérimaire d'un aldéhyde possédant les caractères de l'aldéhyde hydracrylique, premier terme de déshydratation de la glycérine; milieu privé d'oxygène et même réducteur; exothermicité des réactions de transformation de la glycérine en acroléine et de polymérisation de cet aldéhyde; faculté de combustion *interne* dévolue au bacille dans son travail fermentaire en vie anaérobie, je les considère comme *suffisants* par leur entière concordance, sans être même tous *nécessaires*, pour admettre que, soit dans le processus naturel de la maladie de l'amertume des vins, soit dans l'épreuve artificielle de la glycéro-réaction, l'*acroléine naît directement de la glycérine par le mécanisme de la déshydratation progressive de cette substance.*

Habitués que nous sommes à voir les ferments travailler dans le même sens que nos sources d'énergie du laboratoire, nous devons trouver encore un argument favorable à ce mécanisme fermentaire dans cette loi de similitude. Bien plus, si nous comparons avec raison les ferments à des catalyseurs, et

si nous envisageons les résultats des expériences de Senderens (1) sur la déshydratation catalytique de la glycérine par l'alumine ou son sulfate, nous pouvons reconnaître une ressemblance encore plus complète entre ces deux formes, biologique et chimique, du même phénomène.

REMARQUES. I. — Poursuivons l'intéressante comparaison que je viens d'indiquer entre ces soustractions par actions biochimiques, d'eau à la molécule de la glycérine dans sa transformation en acroléine par le *Bacillus amaracrylus*, d'anhydride carbonique à la molécule d'un sucre dans sa transformation en alcool par la levure.

Le dégagement de chaleur qui résulte de cette combustion *intérieure* de la moitié de l'hydrogène de la glycérine est pour le bacille, quoique à un degré beaucoup moindre, ce qu'est à la levure le dégagement de chaleur produit par la combustion *intérieure* du tiers du carbone du sucre. Comme celui de la levure, le protoplasma de ce microbe est organisé à la fois pour vivre au contact de l'air et produire en vie *anaérobie* cette dislocation intérieure de la glycérine et en bénéficier. Quel que soit le rôle, principal ou secondaire, de la formation de l'acroléine, le léger dégagement de chaleur produit dans cette *déshydratation par combustion interne* et la polymérisation partielle subséquente figure au nombre des sources de la vie cellulaire. Dans ce phénomène, comme dans celui de la fermentation alcoolique, nous retrouvons à la suite de Pasteur, et d'après Duclaux, trois notions qui se commandent.

» *Toute vie anaérobie* s'alimente au moyen de la dislocation intérieure d'une matière organique qui est un aliment pour le microbe qui l'utilise et se comporte en présence de son protoplasma comme une sorte de corps explosif, capable de fournir de la chaleur en disloquant et en groupant autrement ses éléments. Ce corps, explosif au contact d'un protoplasma, peut très bien ne pas l'être ou l'être autrement au regard d'un autre.

« Moins il donne de chaleur en se disloquant, plus, d'une manière générale, le microbe qui l'utilise devra en détruire pour suffire à son fonctionnement vital, et plus la puissance de ce microbe comme ferment nous apparaîtra grande. »

(1) *Bull. Soc. Chim.*, 4e série, t. III, p. 828, 1908, et t. IX, p. 374, 1911.

TABLEAU COMPARATIF DES

du *Bacillus amaracrylus* d'un vin amer, du *Bacille* retiré de l'eau,

Caractères communs. — Bacilles ou Coccobacilles; anaérobies facultatifs; ne avec ondes moirées; se développant en bouillon phéniqué à 1 p. 1.000,

CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS	*Bacillus amaracrylus*	*Bacille* de l'eau
Mobilité	Ordinairement très mobile.	Ordinairement très mobile.
Reproduction	Donne parfois des spores en culture ancienne.	Donne parfois des spores en culture ancienne.
Culture *sur pomme de terre*	Culture très minime.	Culture très minime.
Culture *dans le lait*	Coagule rapidement.	Coagule rapidement.
Culture *dans le petit-lait tournesolé*	Rougit très fortement.	Rougit très fortement.
Culture *en milieux lactosés*	Dégagement gazeux H et CO^2.	Dégagement gazeux H et CO^2.
Culture — *glucosés*	Dégagement gazeux H et CO^2.	Dégagement gazeux H et CO^2.
Culture — *au rouge neutre*	Décolore lentement, sans fluorescence nette.	Décolore lentement, sans fluorescence nette.
Culture — *lactosés, à la rosaniline*	Donne des colonies rouges.	Donne des colonies rouges.
Culture *sur gélose au plomb*	Ne noircit pas.	Ne noircit pas.
Formation d'indol	Ne donne pas d'indol.	Ne donne pas d'indol.
Glycéro-réaction	Positive.	Positive.
Virulence	Non pathogène.	Non pathogène.
A dose limite *un Eberth-sérum*	N'agglutine pas.	N'agglutine pas.
A dose limite *un Para A-sérum*	N'agglutine pas.	N'agglutine pas.
A dose limite *un Para B-sérum*	N'agglutine pas.	N'agglutine pas.

CARACTÈRES PRINCIPAUX

du *B. Coli* et des *Bacille Typhiques* et *Paratyphiques A* et *B*.

prenant pas le Gram; donnant par culture dans le bouillon un trouble uniforme à la température de 42°; poussant bien sur la gélatine sans la liquéfier.

B. Coli.	Bacille Typhique	Bacille Paratyphique A	Bacille Paratyphique B
Mobile, parfois immobile.	Ordinairement très mobile.	Très mobile.	Très mobile.
Spores, inconnues ou douteuses.	Spores inconnues ou douteuses.	Spores inconnues.	Spores inconnues.
Enduit épais, jaune ou brun.	Culture minime.	Culture minime.	Ordinairement enduit assez épais, jaune ou brun.
Coagule, parfois tardivement.	Ne modifie pas le milieu.	Ne modifie pas le milieu.	Ne coagule pas, éclaircit tardivement.
Rougit très fortement.	Rougit légèrement.	Rougit franchement.	Rougit très vite, puis bleuit.
Dégagement gazeux H et CO^2.	Ne donne pas de gaz.	Ne donne pas de gaz.	Ne donne pas de gaz.
Dégagement gazeux H et CO^2.	Ne donne pas de gaz.	Dégagement gazeux H et CO^2.	Dégagement gazeux H et CO^2.
Provoque la décoloration et la fluorescence.	Ne modifie pas.	Provoque la décoloration et la fluorescence.	Provoque la décoloration et la fluorescence.
Donne des colonies rouges.	Donne des colonies incolores.	Donne des colonies incolores.	Donne des colonies incolores.
Ne noircit pas (quelques exceptions).	Noircit.	Ne noircit pas.	Noircit.
Donne de l'indol.	Ne donne pas d'indol.	Ne donne pas d'indol.	Ne donne pas d'indol.
Négative.	Négative.	Négative.	Négative.
Pathogène.	Pathogène.	Pathogène.	Pathogène.
N'agglutine pas.	Agglutine.	N'agglutine pas.	N'agglutine pas.
N'agglutine pas.	N'agglutine pas.	Agglutine.	N'agglutine pas.
N'agglutine pas.	N'agglutine pas.	N'agglutine pas.	Agglutine. Exception : type Gärtner.

Ces conceptions, et notamment la dernière, jointes aux faits que j'ai reconnus, surtout à la constatation de la formation et de la destruction continues de l'acroléine au cours de la fermentation, m'autorisent à considérer ce phénomène de déshydratation de la glycérine comme fondamental dans le mécanisme des transformations que le *Bacillus amaracrylus*, originaire d'un vin amer ou de l'eau, fait subir à cette substance, mécanisme dont il semble être en quelque sorte la clef d'ouverture.

II. — Une telle faculté de soustraction d'eau par *voie fermentaire analytique*, jusqu'ici et au moins à ma connaissance, n'a pas encore été démontrée. Il est logique de penser qu'elle n'appartient pas exclusivement à l'être dont j'ai fait l'étude, et de considérer le *Bacillus amaracrylus* comme un *prototype* dans une catégorie d'êtres microbiens qui seraient, eux-mêmes, capables de produire une telle simplification moléculaire, fréquente dans les réactions de la chimie pure.

L'introduction dans la microbiologie de cette notion nouvelle de « *ferment figuré déshydratant à caractère analytique* » contribue à resserrer encore le lien déjà si étroit entre les phénomènes de la chimie pure et ceux de la chimie biologique.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

32e ANNÉE NOVEMBRE 1918 N° 11

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de É. Metchnikoff.

SUR LES CONDITIONS DE LA BACTÉRICIDIE PROVOQUÉE PAR LES SUBSTANCES LEUCOCYTAIRES CHEZ L'ANIMAL

par ALFRED PETTERSSON.

(Travail du Laboratoire bactériologique de l'Institut médical de l'État à Stockholm.)

Dans les recherches sur l'origine de l'alexine dans le sérum sanguin on eut d'abord recours aux globules blancs. En effet, ces cellules étaient considérées comme dépositaires de substances bactéricides et comme la source de l'alexine. Quelques auteurs, comme Buchner, par exemple, voyaient dans l'alexine un produit de sécrétion des leucocytes et dans la sortie des substances bactéricides de ces cellules un véritable acte sécrétoire. D'autres, comme M. Metchnikoff, ont supposé que l'alexine ne quittait les cellules génératrices qu'après leur mort ou qu'à la suite d'une lésion plus ou moins grave. Cependant l'étude des substances bactéricides des leucocytes a montré que ceux-ci possédaient des propriétés tout à fait différentes de celles du sérum sanguin, de sorte qu'aujourd'hui on

peut regarder les substances bactéricides des leucocytes et celles du sérum sanguin comme définitivement différentes. Toujours est-il que, à l'heure actuelle, rien ne prouve que l'alexine de sérum prenne naissance dans les globules blancs.

Bien que l'acte sécrétoire qu'exécutent les leucocytes ne puisse expliquer l'apparition de l'alexine dans le sang, cette hypothèse n'est pourtant pas abandonnée. Schneider [1] croit avoir constaté qu'une dilution de sérum dans de l'eau salée à 5 p. 100 est favorable à la sécrétion de substances bactéricides faite par les leucocytes. Il a donné à ce produit de sécrétion le nom de Leukine.

Ce n'est pas mon intention de discuter ici cette hypothèse. Je me bornerai à examiner si les substances bactéricides des leucocytes exercent l'action microbicide au dehors des cellules, sans me préoccuper du problème si ces substances sont sécrétées par des leucocytes vivants ou bien si elles sont mises en liberté après la mort des leucocytes.

Gruber et Futaki [2] ont observé chez la poule la destruction du bacille charbonneux au dehors des leucocytes. Il faut attribuer cette destruction à l'action des substances leucocytaires, vu l'inefficacité des liquides de cet animal à l'égard dudit bacille. Comme je l'ai démontré auparavant [3], on peut préserver le lapin contre l'infection charbonneuse en inoculant chez lui simultanément les bacilles et l'extrait leucocytaire. Il en résulte que chez lui l'extrait détruit les bacilles même à l'intérieur de l'animal, c'est-à-dire que les substances bactéricides leucocytaires agissent sur ces bacilles au dehors des leucocytes. Weil [4] et Suzuki [5] ont prouvé la destruction de certains micrococques saprophytes au dehors des leucocytes au moyen de leurs substances bactéricides. Ils ont donné à ce phénomène le nom d'aphagocidie.

La destruction extracellulaire des microbes provoquée par les substances bactéricides des leucocytes est donc démontrée. Seulement les conditions dans lesquelles elle se réalise sont peu connues ; avant tout nous ne savons pas si les bactéries en général sont susceptibles de subir cette forme de bactériolyse. Les recherches suivantes contribueront, je l'espère, à la solution de ce problème.

J'ai montré, il y a quelques années, qu'on peut se rendre compte de l'action bactéricide des leucocytes en les injectant à l'animal, mêlés avec les bactéries sur lesquelles on veut examiner leur effet. Dans le cas où les bactéries sont englobées par les leucocytes, l'expérience ne prouve pourtant pas que les substances bactéricides soient sorties de l'intérieur des leucocytes. En supposant qu'il en soit ainsi, il ne s'ensuit pas qu'elles auraient été capables d'exercer leur action également au dehors des cellules. Pour trancher cette dernière question, il est nécessaire d'éliminer la phagocytose des bactéries, ce qui peut se faire, si l'on exalte la virulence de ces dernières.

* * *

Je vais commencer par citer quelques expériences faites avec le bacille du charbon. Celui-ci avait passé récemment par plusieurs lapins, et le virus à injecter provenait de la rate d'un animal venant de mourir. Les bâtonnets étaient tous encapsulés et non susceptibles de se laisser phagocyter par les leucocytes de lapin.

Expérience I

Une goutte de suc exprimé de la rate d'un lapin, mort de charbon, fut mise dans l'eau salée. On en préleva une quantité déterminée qui fut mélangée avec des leucocytes frais de lapin. Le mélange fut ensuite injecté, à un lapin neuf, sous la peau.

Lapin de 1.350 grammes, reçut 1/50 goutte de suc de la rate charbonneuse et 1 gr. 75 de leucocytes frais du lapin. Survit.

Lapin de 1.350 grammes, reçut 1/25 goutte du même suc et 1 gr. 75 de leucocytes de lapin. Survit.

Lapin de 1.400 grammes, reçut 1/50 goutte du même virus charbonneux. Il mourut le 3e jour.

Expérience II

Mêmes dispositions. Le virus charbonneux provenait du dernier lapin de l'expérience précédente.

Lapin de 1.400 grammes, reçut 1/20 goutte de virus charbonneux et 1 gr. 5 de leucocytes de lapin. Survit.

Lapin de 1.400 grammes, reçut 1/10 goutte de virus et 1 gr. 5 de leucocytes frais de lapin. Survit.

Lapin de 1.380 grammes, reçut 1/20 goutte de virus. Il mourut le surlendemain.

Expérience III

Mêmes dispositions. Le virus provenait d'un lapin inoculé avec la rate du dernier lapin de l'expérience II.

Lapin de 1.850 grammes, reçut 1/15 goutte de virus et 1 gr. 3 de leucocytes frais de lapin. Survit.

Lapin de 1.140 grammes, reçut 1/10 goutte du même virus et 1 gr. 3 de leucocytes frais de lapin. Survit.

Lapin de 1.000 grammes, reçut 1/5 goutte du même virus et 1 gr. 3 de leucocytes frais de lapin. Survit.

Lapin de 1.350 grammes reçut 1/15 goutte de virus. Il mourut de charbon le surlendemain.

Il est donc évident que ce sont les leucocytes qui ont détruit les bacilles charbonneux. D'autre part, on peut être sûr que les leucocytes n'ont pas englobé les bacilles, sinon en très petit nombre, l'origine employée (Sobernheim) ayant dès le début une très grande virulence et celle-ci étant encore augmentée par suite de plusieurs passages par le lapin. Par conséquent, on doit conclure que les bacilles ont été tués au dehors des leucocytes. Mais, comme les humeurs de lapin sont *in vivo* sans action sur le bacille charbonneux, la destruction en question a dû se faire à l'aide des substances bactéricides provenant des leucocytes. Cette supposition se trouve d'accord avec le fait que l'extrait des leucocytes exerce une action protectrice contre l'infection charbonneuse.

D'aucuns ont cherché à expliquer l'immunité acquise contre le charbon par la présence de bactériotropines ; par conséquent, la sensibilité de l'animal neuf serait causée par le manque de ces substances. En effet, Gruber et Futaki [2] ont supposé que la réceptivité du lapin au charbon est due à ce que des bacilles encapsulés sont réfractaires à l'action phagocytaire. Comme le démontrent les expériences, il n'en est pas ainsi du lapin. Cet animal ne manque pas du tout de moyens de défense contre le charbon, mais ceux-ci ne sont pas mis en œuvre lors de l'infection. Il ne se produit ni hyperleucocytose, ni accumulation de leucocytes au lieu d'infection chez le lapin neuf. Mais si l'on produit une hyperleucocytose artificielle, on rend le lapin résistant tout comme le chien et la poule. On ne peut pourtant pas affirmer que l'action protectrice des leucocytes de

lapin soit très considérable, car il en faut une assez grande quantité pour faire ressortir cette action.

J'ai entrepris ensuite des recherches analogues avec le streptocoque. La race employée a d'abord été étudiée par M. Holst. Pendant plusieurs années, elle a conservé pour le lapin une virulence assez constante et très considérable.

TABLEAU I

Des leucocytes frais de lapin, émulsionnés dans 2 cent. cubes d'eau salée furent mélangés avec 1 cent. cube d'une dilution de culture streptococcique en bouillon. Le mélange fut injecté, sous la peau, à des lapins neufs. La colonne indiquant la quantité injectée de la culture streptococcique contient également le nombre des colonies développées après ensemencement de la culture.

QUANTITÉS DE CULTURE	QUANTITÉS de LEUCOCYTES	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX DE CONTRÔLE	
		Poids	Résultats	Poids	Résultats
1/1.000.000.000.000 c.c. = 31 colonies.	1 gr. 2	1.750 gr.	+ après 3 j.	1.650 gr.	+ après 3 j.
1/1.000.000.000 c.c. = 688 colonies.	2 gr. 0	1.510 gr.	+ après 3 j.	1.430 gr.	+ après 2 j.
1/ 50.000.000 c.c. = 806 colonies.	1 gr. 2	1.700 gr.	+ après 1 j.	1.650 gr.	+ après 2 j.
1/ 10.000.000 c.c. = 1.504 colonies.	1 gr. 6	1.800 gr.	Survit.	1.500 gr.	+ après 3 j.

TABLEAU II

Mêmes dispositions qu'au tableau précédent. Injection dans la plèvre.

QUANTITÉS DE CULTURE	QUANTITÉS de LEUCOCYTES	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX DE CONTRÔLE	
		Poids	Résultats	Poids	Résultats
1/50.000.000 c.c. = 124 colonies.	1 gr. 3	1.430 gr.	+ après 2 j.	1.430 gr.	+ après 3 j.
1/10.000.000 c.c. = 1.440 colonies.	1 gr. 0	1.710 gr.	+ après 2 j.	1.620 gr.	+ après 2 j.

Des prélèvements faits aux lieux d'infection montraient toujours un manque de phagocytose. On voit que l'addition des leucocytes n'a pas eu le moindre effet sur l'infection. Mais on peut se demander si les leucocytes ont mis en liberté des substances bactéricides. Voilà pourquoi j'ai répété les expériences avec de l'extrait leucocytaire.

Dans une autre série, j'ai injecté aussi bien des leucocytes que de l'extrait leucocytaire.

TABLEAU III

Un extrait fut fait des leucocytes frais de lapin congelés et dégelés plusieurs fois dans 2 cent. cubes d'eau salée. L'extrait, séparé des débris cellulaires par centrifugation, fut mêlé avec 1 cent. cube de bouillon septrococcique dilué et injecté, sous la peau, à des lapins neufs.

QUANTITÉS DE CULTURE	QUANTITÉS de LEUCOCYTES	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX DE CONTRÔLE	
		Poids	Résultats	Poids	Résultats
1/5.000.000.000 c.c. = 26 colonies.	1 gr. 0	1.500 gr.	+ ap. 1 j. 1/2.	1.450 gr.	+ ap. 1 j. 1/2.
1/1.000.000.000 c.c. = 89 colonies.	1 gr. 0	1.500 gr.	+ après 2 j.	1.450 gr.	+ après 2 j.
1/1.000.000.000 c.c. = 152 colonies.	1 gr. 0	1.470 gr.	+ après 1 j.	1.650 gr.	+ après 2 j.

TABLEAU IV

Mêmes dispositions qu'au tableau III. Injection dans la plèvre.

QUANTITÉS DE CULTURE	QUANTITÉS de LEUCOCYTES	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX DE CONTRÔLE	
		Poids	Résultats	Poids	Résultats
1/10.000.000.000 c.c. = 13 colonies.	1 gr. 5	2.000 gr.	+ après 1 j.	1.600 gr.	Survit.
1/ 1.000.000.000 c.c. = 17 colonies.	1 gr. 5	1.450 gr.	+ après 1 j.	1.400 gr.	+ après 1 j.
1/ 500.000.000 c.c. = 18 colonies.	1 gr. 5	1.370 gr.	+ après 2 j.	1.370 gr.	Survit.

TABLEAU V

Mêmes dispositions qu'au tableau IV. Le mélange des leucocytes de l'extrait et du bouillon streptococcique fut injecté, sous la peau, à des lapins neufs.

QUANTITÉS DE CULTURE	QUANTITÉS de LEUCOCYTES et quantités DE L'EXTRAIT	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX DE CONTRÔLE	
		Poids	Résultats	Poids	Résultats
1/5.000.000.000 c.c. = 10 colonies.	0 gr. 75 de leucocytes + extrait de 0 gr. 5 de leucocytes.	2.000 gr.	Survit.	1.950 gr.	+ ap. 2 j.
1/ 500.000.000 c.c. = 126 colonies.	0 gr. 75 de leucocytes + extrait de 0 gr. 5 de leucocytes.	1.280 gr.	+ ap. 2 j.	1.150 gr.	+ ap. 1 j.
1/ 100.000.000 c.c = 180 colonies.	0 gr. 75 de leucocytes + extrait de 0 gr. 5 de leucocytes.	1.200 gr.	+ ap. 1 j.	1.340 gr.	+ ap. 1 j.
1/ 50.000.000 c.c. = 174 colonies.	1 gr. 0 de leucocytes + extrait de 0 gr. 6 de leucocytes.	1.220 gr.	+ ap. 3 j.	1.220 gr.	+ ap. 2 j.

Un manque de rapport a souvent été constaté entre les quantités de culture et le nombre de germes qu'elles contenaient. Ce fait tient à ce que les cultures n'avaient pas toujours le même âge. Or il ressort des expériences qu'une dizaine environ de streptocoques constituait la dose minima mortelle. J'ai essayé d'éviter de trop dépasser ce nombre. Toutefois, ni les leucocytes, ni l'extrait leucocytaire, ni les deux ensemble n'ont produit d'effet quelconque sur les bactéries. Il s'ensuit que, si des substances bactéricides sont vraiment sorties des leucocytes, leur action bactéricide a probablement été supprimée au dehors des leucocytes, car les quantités injectées de l'extrait devaient suffire pour tuer quelques dizaines de streptocoques.

Il était alors de grand intérêt de savoir si l'extrait leucocytaire renforce l'action protectrice du sérum antistreptococ-

cique. Pour cette recherche, je me suis servi du sérum d'un lapin immunisé avec le streptocoque employé.

TABLEAU VI

5 lapins neufs furent inoculés avec des doses croissantes d'une culture de streptocoque en bouillon. La quantité de culture à inoculer fut mêlée avec 0 c.c. 1 de sérum antistreptococcique et l'extrait de 0 c.c. 5 de leucocytes frais de lapin. Il ne fut injecté aux animaux de contrôle que les quantités correspondantes de culture et 0 c.c. 1 de sérum.

	QUANTITÉS de culture STREPTOCOCCIQUE	EXTRAIT DE LEUCOCYTES	RÉSULTATS
Lapin de 630 gr.	0 c. c. 03	0	Survit.
Lapin de 550 gr.	0 c. c. 03	+	Survit.
Lapin de 850 gr.	0 c. c. 1	0	Survit.
Lapin de 740 gr.	0 c. c. 1	+	Mort après 3 jours.
Lapin de 940 gr.	0 c. c. 3	0	Mort après 3 jours.
Lapin de 960 gr.	0 c. c. 3	+	Mort après 4 jours.
Lapin de 1.000 gr.	1 c. c. 0	0	Mort après 3 jours.
Lapin de 1.000 gr.	1 c. c. 0	+	Mort après 3 jours.

D'autres expériences ont donné un résultat analogue.

L'addition de l'extrait leucocytaire n'a pas amené une augmentation de la force protectrice du sérum. J'ai encore examiné si l'action du sérum est renforcée par les leucocytes intacts. Dans les nombreuses expériences que j'ai entreprises dans ce but, un effet produit par les leucocytes ne fut jamais observé. Ce résultat assez surprenant ressort, selon moi, de l'expérience suivante.

EXPÉRIENCE IV

Un lapin neuf fut inoculé sous la peau avec environ 300.000 streptocoques et 1 c.c. 0 de sérum antistreptococcique. La même dose de streptocoques et de sérum, mais mêlée avec des leucocytes frais de lapin, fut injectée à un autre lapin. De temps à autre on fait des prélèvements au lieu d'inoculation.

Lapin de 1.850 grammes, injecté avec 300.000 streptocoques et 1 c.c. 0 de sérum antistreptococcique.

Lapin de 1.800 grammes, injecté avec 300.000 streptocoques, 1 c. c. 0 de sérum antistreptococcique et 0 gr. 6 de leucocytes. Immédiatement après l'injection, les streptocoques étaient en grande minorité, comparés aux leucocytes.

Après 6 heures : Accroissement apparent des streptocoques, peu de leucocytes, pas de phagocytose.	Après 6 heures : Les streptocoques dont la plupart sont libres et bien colorés, plus nombreux que lors de l'injection. Des cellules isolées seules de la grande quantité de leucocytes ont englobé un couple ou deux de diplocoques.
Après 22 heures : Un extrêmement grand nombre de leucocytes, les streptocoques sont à peu près aussi nombreux que 6 heures après l'inoculation, çà et là des leucocytes ayant englobé des diplocoques.	Après 22 heures : A peu près le même aspect que chez l'autre lapin.
Après 30 heures : Les streptocoques sont moins nombreux qu'au moment du prélèvement précédent, la phagocytose plus avancée.	Après 30 heures : Décroissement des streptocoques libres, phagocytose plus fréquente.

En 1897, Bordet [6] a constaté que l'inoculation intrapéritonéale des streptocoques était suivie d'un afflux considérable des leucocytes. Mais la phagocytose faisait complètement défaut pendant les premières heures. Les streptocoques, par contre, se multipliaient considérablement. Ce n'est qu'après ce délai que les leucocytes commençaient à englober les streptocoques, et la cavité péritonéale ne tardait pas à en être débarrassée. Le même phénomène s'observe, comme on le voit, aussi chez le lapin passivement immunisé. Il est facile de comprendre pourquoi les leucocytes introduits lors de l'inoculation n'ont pu changer la marche de l'infection chez le lapin passivement immunisé. La phagocytose des streptocoques inoculés ne s'effectue jamais immédiatement après l'inoculation. Pendant le temps qui s'écoule jusqu'au commencement de ce procédé, les leucocytes de l'animal en expérience se sont amassés en quantité tout à fait suffisante pour englober les streptocoques.

Il résulte aussi de ces expériences que les streptocoques ne sont jamais tués au dehors des leucocytes, qu'il s'agisse d'un lapin neuf, vacciné ou passivement immunisé. Certes, on ne peut pas conclure de ces expériences que des substances agissant sur les streptocoques ne quittent les leucocytes dans le corps animal. Mais si elles le font, leur action doit être paralysée après la sortie des leucocytes. Les leucocytes ont été aussi inefficaces à l'égard des streptocoques que l'extrait dans

les expériences précédentes. J'ai déjà montré que l'action des substances bactéricides des leucocytes est supprimée *in vitro* par divers colloïdes, entre autres, par l'albumine du blanc d'œufs ou du sérum [7]. Ce sont probablement des corps analogues qui rendent ces substances inefficaces aussi chez l'animal.

Des recherches, effectuées dans ce laboratoire, encore inédites, de M. Tillgren ont mis en évidence un fait absolument analogue pour le pneumocoque, dont la virulence avait été exaltée par des passages chez le lapin. L'infection pneumococcique du lapin ne saurait être influencée ni par les leucocytes frais, ni par l'extrait leucocytaire.

M. Lindahl [8] a examiné ce qui se passe dans la chambre antérieure de l'œil lorsqu'on y introduit des leucocytes frais. Des streptocoques et des pneumocoques furent étudiés également. Il pouvait constater que l'œil dans lequel avaient été introduit des leucocytes, se débarrassait vite des microbes inoculés, tandis que dans l'autre œil ce phénomène ne se produisait point ou bien seulement après un très long laps de temps. Les leucocytes avaient donc augmenté la résistance à l'infection produite par lesdits microbes. Ce fait ne contredit, bien entendu, nullement les résultats obtenus par les recherches mentionnées ci-dessus. Les microbes employés par M. Lindahl n'ayant, à l'encontre des races employées maintenant, qu'une virulence médiocre, les leucocytes les englobaient énergiquement.

Il est intéressant de rapprocher la marche de la pneumonie aiguë chez l'homme et les faits signalés plus haut. Les pneumocoques, on le sait, se multiplient et les leucocytes s'accumulent dans les alvéoles pulmonaires sans provoquer de phagocytose, sinon à un faible degré. Les pneumocoques sont évidemment trop virulents pour être englobés par les leucocytes. Quoiqu'il se produise une désagrégation assez considérable des leucocytes, suivie de mise en liberté de substances bactéricides, il semble que cette circonstance n'exerce aucune influence sur les pneumocoques, et que l'hépatisation du poumon n'en progresse pas moins. Ce n'est qu'au moment où les bactériotropines sont en quantité suffisante pour provoquer une phagocytose générale des pneumocoques que survient la

crise salutaire. Il n'existe donc pas, à mon avis, chez l'homme de pouvoir bactéricide à l'égard des pneumocoques dû aux substances issues des leucocytes. Une mise en liberté des substances analogues existe indubitablement lors de la désagrégation consécutive à la mort des leucocytes, et ces substances agissent *in vitro* sur les pneumocoques. La suppression de leur action chez l'animal doit donc être attribuée à la force paralysante des humeurs.

Conclusions.

Le bacille du charbon est, chez le lapin, sensible à l'action des substances bactéricides des leucocytes, aussi en dehors des cellules. Les bâtonnets encapsulés ne font pas exception à cette règle. La réceptivité du lapin au charbon n'est donc pas due à ce que le bacille du charbon se soustrait à la phagocytose mais au manque d'hyperleucocytose après l'infection et au manque relatif de substances bactéricides des leucocytes.

Chez le lapin, les substances bactéricides des leucocytes sont sans action sur les streptocoques en dehors de leucocytes; dans le cas seul où les streptocoques ont été englobés, ils sont tués par les leucocytes.

Il en est de même du pneumocoque chez le lapin et chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Schneider. — *Archiv für Hygiene*, t. 70.
[2] Gruber et Futaki. — *Münchener med. Wochenschrift*, 1907.
[3] Petterssox. — *Centralblatt f. Bakteriologie*, Abt. I, t. 52.
[4] Weil. — *Wiener klin. Wochenschrift*, 1911.
[5] Suzuki. — *Archiv für Hygiene*, t. 74.
[6] Bordet. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1887.
[7] Petterssox. — *Centralblatt f. Bakteriologie*, Abt. I, t. 60.
[8] Lindahl. — *Archiv für Augenheilkunde*, t. 67, Ergänzungsheft.

RECHERCHES SUR LE BACILLE DE BORDET

ET SON APPARITION DANS LA COQUELUCHE

par le Dr H. GIESE,
Médecin départemental à Bornholm.

Tandis que les descriptions bactériologiques de l'expectoration de la coqueluche sont essentiellement d'accord chez les différents auteurs, les tentatives de culture donnent des résultats plus ou moins divergents.

Après que Bürger eut décrit en 1883 de petits bacilles ovoïdes dans l'expectoration coquelucheuse, la plupart des observateurs ont trouvé de semblables microbes tantôt teints seulement aux extrémités, tantôt teints d'une manière plus diffuse, et on les a trouvés en si grand nombre, surtout au début de l'affection, qu'il paraissait naturel de leur attribuer une importance étiologique. Les bactéries isolées sont toutes — excepté le bacille assez grossier et trapu, trouvé par Afanasieff, dont la croissance était semblable à celle du bac. coli — de petits bacilles délicats (environ 1 μ de longueur) qui ressemblent morphologiquement au bacille de Pfeiffer. Elles se divisent en deux groupes : les bactéries hémoglobinophiles et les bactéries non hémoglobinophiles. Ce dernier groupe comprend les bactéries trouvées par Czaplewski et Hensel, par Kaplic, Nusch, Vincenzi, Arnheim, Gochmann et Krause (Bac. I) et Manicatide. Elles se développent toutes sur de la gélose et dans du bouillon, tandis que les bactéries d'Elmassian et de Suzzato ne se développent dans ces milieux qu'après l'addition de liquide d'ascite ou d'hydrocèle. Les bactéries hémoglobinophiles sont cultivées à l'état pur de l'expectoration coquelucheuse par Spengler, Gochmann et Krause, Reyher et Bordet et Gengou. De toutes ces bactéries dont quelques-unes, d'après les descriptions présentes, sont probablement identiques, c'est surtout le bacille de Czaplewski, celui de Gochmann et Krause

et celui de Bordet qui ont attiré l'attention. Les recherches de Czaplewski sont essentiellement attestées par Arnheim (dans ses travaux de 1900 et de 1903) et par Reyher (1903, 1905) qui a constaté aussi la présence du bacille de Czaplewski dans des coupes du larynx, où il se trouvait dans les cellules plates de l'épithélium, mais non dans les cellules cylindriques; par contre, des tentatives d'agglutination avec le sérum de convalescents de la coqueluche ont donné des résultats négatifs.

La présence de la bactérie hémophile de Gochmann et de Krause (*Bac. pertussis* Eppendorf) qui, en culture et au microscope, ne se distingue pas du bacille de l'influenza de Pfeiffer, a été constatée aussi par Wollstein, Wohlwill, Soulima (ce dernier l'identifie au bacille Bordet) et d'autres dans l'expectoration de la coqueluche, tandis que Tedesco a démontré à l'aide de nombreuses autopsies que des microbes semblables à ceux de l'influenza se trouvent souvent dans des cas d'affections catarrhales des poumons; cette découverte, qui a été confirmée cliniquement, affaiblit extrêmement la supposition du bacille de Gochmann et de Krause comme agent étiologique de la coqueluche.

Il y aurait lieu de nommer ici le bacille de Manicatide dont la présence — d'après les recherches de cet auteur — se constate presque constamment dans l'expectoration coquelucheuse (sur 200 cas il n'y en avait que 12 négatifs); il donne une séroréaction positive avec le sérum d'enfants atteints de la coqueluche (réaction de fixation du complément, positive dans 19 cas, 6 cas de contrôle tous négatifs; l'agglutination 1 : 60-1 : 100 dans 28 cas; cas de contrôle tous négatifs); de même, on dit que la sérothérapie et la séroprophylaxie employées par l'auteur avec le sérum de chevaux et de moutons traités par ce bacille se sont montrées très effectives. Pourtant, jusqu'à présent personne n'a publié de recherches ultérieures sur les résultats de Manicatide.

En 1906, la communication de Bordet et Gengou sur le bacille trouvé par eux dans l'expectoration coquelucheuse a paru, et plus tard la discussion a porté presque exclusivement sur le rôle étiologique de ce bacille dans la coqueluche. Les résultats des recherches de culture ont attesté la découverte de Bordet et Gengou, que le bacille isolé par eux de l'expecto-

ration de la coqueluche se trouve dans un grand nombre d'affections coquelucheuses, la quantité des résultats positifs vérifiés par la culture variant pourtant beaucoup. Ainsi, Seiffert, Klimenko, Inaba et Finizio ont réussi à cultiver le bacille de Bordet à l'état pur, dans respectivement 12 cas sur 16, 5 sur 5, 68 sur 77 et 13 sur 16, tandis que Fränkel a eu 8 cultures pures provenant de 38 cas, Arnheim, 6 de 20 cas, Odaira, 6 de 35 cas et Wollstein, 5 de 20 cas. Toutes ces recherches ont permis d'isoler le bacille-Bordet de l'expectoration coquelucheuse. Quant aux autopsies, la culture pure provenant des poumons a réussi 2 fois sur 7 pour Odaira, 1 fois pour Wollstein, tandis que les 6 autopsies de Arnheim ont donné toutes un résultat négatif. Seiffert a isolé le bacille de Bordet des poumons, des bronches, du foie et du sang d'un malade atteint de la coqueluche et mort d'une broncho-pneumonie. Klimenko a cultivé lui aussi à l'état pur le bacille-Bordet provenant des poumons et du sang de l'oreillette droite d'un malade atteint de la coqueluche et mort de *Pneumonia catarrhalis* et de *Pleurisis fibrino-purul.* Le plus souvent la culture a réussi quand le bacille provenait de l'expectoration crachée pendant la 1re ou la 2e semaine de l'affection, rarement quand celle-ci était crachée pendant les périodes ultérieures. On a pourtant obtenu des résultats positifs dans des tentatives de culture des crachats recueillis pendant la 7e ou la 8e semaine du stade convulsif.

Tandis qu'assez souvent on a isolé et cultivé à l'état pur le bacille-Bordet provenant de l'expectoration coquelucheuse, malgré beaucoup de tentatives, on n'a jamais pu le faire de l'expectoration de malades non atteints de la coqueluche. Au microscope, on a plusieurs fois constaté la présence de microbes qui semblaient identiques au bacille-Bordet dans l'expectoration d'enfants non atteints de la coqueluche; c'est ainsi que Fränkel l'a trouvé, mais peu nombreux, chez deux enfants atteints de tuberculose. Poleff a réussi à isoler et cultiver à l'état pur un microbe semblable au bacille-Bordet d'un cas de rougeole, mais la culture est morte avant d'avoir été examinée davantage, de sorte qu'on n'a pu constater son identité avec le bacille-Bordet.

La communication de Bordet et Gengou, sur la présence dans le sérum des convalescents de la coqueluche, d'anticorps

fixant le complément et d'agglutinines correspondant au bacille-Bordet, était de grand intérêt. Jusqu'à présent ces indications ne sont confirmées qu'en partie. Quant à l'agglutination une série de travaux ont montré qu'elle est essentiellement inconstante, et que d'autres bacilles semblables à celui de l'influenza sont aussi quelquefois agglutinés par le sérum coquelucheux, parfois à un titre plus élevé que le bacille Bordet (Wollstein, Finizio); quant aux anticorps fixant le complément on n'a fait que très peu d'expériences avec différents résultats. La plupart des expériences ont été faites par Arnheim qui, sur 15 épreuves de sérum, a trouvé 12 de positifs, tandis que les 27 sérums de Bacher et Menschikoff ont donné tous une réaction négative. Klimenko a examiné un seul cas qui a donné une réation positive, Fränkel, 5 cas (1 +, 4 —), Seiffers, 1 cas (positif), Menschikoff, 2 cas (positifs), Poleff, 2 cas (négatifs), Finizio, 8 cas (6 +, 2 —), Schiza, 6 cas (5 +, 1 —) et Wollstein, 9 cas, tous négatifs.

Des tentatives pour provoquer la coqueluche expérimentale par une infection d'animaux faite avec une culture pure du bacille-Bordet ont été essayées par Klimenko, Wollstein, Fränkel, Inaba et Mallory, Horner et Hendersen; leurs résultats joints à ceux de Fränkel et de Inaba confirment la supposition que le bacille-Bordet est le microbe spécifique de la coqueluche.

Tandis que le bacille de Bordet a été bien examiné et caractérisé par les recherches bactériologiques faites jusqu'à présent, de sorte qu'on ne peut en attendre de nouveaux résultats, les recherches bactérioscopiques faites à la clinique sur l'expectoration de la coqueluche semblent pourtant avoir été traitées d'une manière un peu injuste; ceci porte aussi au plus haut degré sur les expériences sérologiques faites à la clinique, qui ont été peu nombreuses et faites avec des méthodes techniques variables presque sans examens de contrôle, et qui ont donné des résultats contradictoires. Comme ces expériences sont d'une importance essentielle, sinon décisive quant à la question du rôle étiologique du bacille-Bordet dans la coqueluche, il y aura lieu de traiter cette question d'une manière plus complète et avec un plus grand matériel.

I

RECHERCHES BACTÉRIOLOGIQUES

Tandis qu'on a fait déjà des recherches bactérioscopiques assez nombreuses mais détachées sur l'expectoration de la coqueluche, on ne trouve pas de recherches suivies sur les découvertes bactérioscopiques aux différents stades de l'affection avec un matériel relativement grand et avec la même technique de coloration. Par l'examen de 108 cas de coqueluche dans lesquels l'expectoration était prise autant que possible dans des circonstances analogues qui, d'après ma supposition, offraient une garantie assez bonne contre l'addition de salive, j'ai essayé de procurer une telle série.

Il résulte de l'examen que l'expectoration coquelucheuse aux premiers stades de l'affection contient presque constamment de nombreux petits microbes qui, d'après tout ce qu'on a pu constater, comptent probablement parmi ceux du groupe de l'Influenza.

Par des examens comparatifs de l'expectoration de malades atteints d'autres affections catarrhales des voies respiratoires surtout de la rougeole, de la bronchite accompagnant la scarlatine, de la laryngite et du croup, on voit que l'aspect des préparations bactérioscopiques n'est pas le même si ces préparations proviennent des maladies en question ou de la coqueluche, l'expectoration coquelucheuse se caractérisant par le nombre extraordinaire de microbes semblables à celui de l'influenza, en comparaison du reste de la flore, tandis que des formes analogues ne se trouvent pas du tout ou se trouvent seulement en petit nombre dans les maladies ci-dessus mentionnées.

Surtout dans la rougeole, dont la période catarrhale de l'incubation est la même que celle de la coqueluche, on a souvent trouvé dans l'expectoration des bacilles semblables à celui de l'influenza, mais — contrairement à ce qu'on trouve dans la coqueluche — en quantité beaucoup plus faible que celle du reste de la flore. J'ai donné toute mon attention à la période

de l'incubation, examinant dans 3 cas l'expectoration tous les jours, dès le 10e jour au plus tard jusqu'à l'apparition de l'exanthème, sans jamais trouver de la ressemblance avec l'expectoration coquelucheuse.

Au début de la coqueluche l'expectoration est donc caractérisée par son contenu de petits bâtonnets semblables à ceux de l'influenza, ce qui nous donne un moyen presque suffisant de la distinguer de celle des maladies mentionnées. On trouvera à peine un aspect semblable des préparations microscopiques dans d'autres maladies, si ce n'est dans l'Influenza.

Quant à l'aspect des préparations aux différents stades de la coqueluche, on voit que l'apparition et le nombre des bâtonnets ressemblant à ceux de l'Influenza sont en rapport avec les semaines de la maladie. Bien que la présence des microbes mentionnés se constate le plus souvent pendant tout le cours de la maladie, c'est la règle qu'ils ne se montrent en grand nombre que jusqu'à la fin de la 3e semaine du stade convulsif. A ce propos un seul cas est intéressant, les microbes caractéristiques se montrant de nouveau en grand nombre à l'occasion d'une réapparition du stade convulsif, 4 mois après la première infection, tandis que l'examen de l'expectoration avait donné pendant les temps précédents un résultat négatif (récidive?).

Dans 19 cas, on a fait l'ensemencement de l'expectoration coquelucheuse sur le milieu de gélose-sang de Bordet et on a réussi 5 fois à isoler le bacille-Bordet ; dans presque tous les cas on a trouvé en outre des bacilles semblables à ceux de l'Influenza, ce qui peut expliquer le nombre relativement petit de résultats positifs des tentatives de culture, le bacille de Bordet se laissant caçher par les autres microbes et empêcher dans son développement par l'infection mélangée.

Pour contrôler on a fait des tentatives d'ensemencement avec l'expectoration de la rougeole par la méthode technique de Bordet, on a réussi à en isoler 3 souches semblables à celle de l'Influenza et non identiques au bacille de Bordet.

Le but des tentatives de culture a été avant tout d'isoler le bacille-Bordet, et par conséquent le matériel a été choisi relativement à celui-ci, les souches isolées des microbes ressemblant à celui de l'Influenza — abstraction faite du bacille-Bordet

— ne représentent donc pas les différentes espèces du groupe qui peuvent se rencontrer dans l'expectorat coquelucheux, mais ne représentent que quelques souches qui, pendant les premières générations, en culture et au microscope, ne se distinguent pas avec certitude du bacille de Bordet.

Quant à la microscopie et à la culture les souches cultivées à l'état pur forment trois groupes dont le premier contient le bacille-Bordet, le deuxième 17 des autres souches isolées de l'expectoration coquelucheuse. Celles-ci se comportent essentiellement comme les bacilles de l'Influenza. Le troisième groupe contient deux souches appelées dans ce qui suit la soucne n° 74 et la souche « abcès » ; ces deux souches se placent sous plusieurs rapports entre les deux premiers groupes, bien qu'elles soient assez différentes entre elles.

L'examen bactériologique qui suit s'accorde tout à fait avec la description du bacille-Bordet par Bordet et Gengou, description dont les détails ont été ultérieurement approfondis par Klimenko dans une série de mémoires; d'ailleurs on trouve dispersées dans la littérature beaucoup d'observations peu importantes et quelquefois contradictoires (Inaba, Wollstein, Arnheim et d'autres).

Le bacille de Bordet est un microbe ovoïde, de 1 μ de longueur et 1/3 μ de largeur, dont la grandeur varie souvent, tandis que la forme est assez constante. Dans les préparations de cultures purifiées, les bacilles sont disséminés sans ordre, souvent deux par deux, bout à bout; ils ne forment pas de fils; dans un milieu liquide, quelquefois des chaînettes de 3 à 4 éléments, mais ils se disposent généralement en colonies. Quand on les cultive continuellement sur la gélose-sang de Bordet, ils diminuent de grandeur pour se présenter peu à peu comme de petits coccobacilles de 1/2 à 3/4 μ de longueur; si on leur fait subir un passage dans un milieu liquide, ils prennent de nouveau leur forme originaire.

Le bacille de Bordet est immobile; il ne prend pas le Gram. Il se colore assez bien avec les couleurs ordinaires d'aniline, vigoureusement avec un bleu de méthylène alcalin (Löffler). Avec un bleu de toluidine phéniqué, le bacille-Bordet ne se teint que faiblement et d'une couleur lilas, propriété commune la plupart des microbes hémophiles; cette teinture (méta-

chromatique) n'est pas tout à fait constante; dans des cultures pures on trouve quelquefois des colonies d'un bleu net, appartenant aussi bien au bacille-Bordet qu'aux autres bacilles semblables à celui de l'influenza, circonstance sur laquelle Klimenko a déjà attiré l'attention.

Coloré avec le bleu de toluidine phéniqué, le bacille-Bordet ne se teint essentiellement que sur les contours et surtout aux extrémités, tandis que l'intérieur des microbes n'est teint que d'une couleur relativement faible. La coloration des extrémités se trouve aussi, bien que moins accentuée, si la teinture se fait avec une solution aqueuse d'un bleu de toluidine ; si on emploie la fuchsine phéniquée (Gabbet) 1 — 20, elle n'est que très peu accentuée, quelquefois seulement après une différenciation prudente avec de l'alcool absolu, tandis que les bacilles se teignent d'une manière diffuse avec le bleu de méthylène de Löffler. La teinture élective des extrémités peut aussi faire défaut (Seiffert, Inaba), mais d'après mon expérience, ceci ne se voit que dans des cultures un peu âgées et qui ont été cultivées continuellement sur le milieu de gélose-sang de Bordet ; la coloration des extrémités a été constante chez moi dans des cultures fraiches du milieu de gélose-sang de Bordet, ensemencé d'un milieu liquide.

Contrairement à Klimenko, je n'ai jamais observé des grains de Babes-Ernst.

Le bacille de Bordet demande une grande abondance d'oxygène. En culture, il désire la présence de l'hémoglobine, mais celle-ci n'est pourtant pas nécessaire ; d'après Bordet et Jengou le bacille se développe aussi sur des milieux sans hémoglobine qui contiennent du liquide d'ascite, du sérum, etc. Odaira a cultivé une souche originale du professeur Bordet sur le milieu alcalin ordinaire de bouillon peptonisé et gélosé, et Klimenko a réussi plusieurs fois, grâce à une acclimatation graduelle (au bout de quelques mois), à faire pousser le bacille-Bordet sur de la gélose alcaline. Seulement une de mes souches a végété abondamment sur gélose-ascite après plusieurs ensemencements renouvelés, tandis que je n'ai pu la faire pousser sur la gélose ordinaire que pendant deux ou trois générations. Les autres quatre souches ont demandé nécessairement la présence du sang (l'une d'elles observée pendant 6 mois, l'autre pen-

dant 2-3 mois) et ce fut le même cas pour les 8 souches isolées par Fränkel. Le bacille-Bordet est donc essentiellement hémoglobinophile, mais pour quelques souches on peut continuer la culture sur gélose-ascite sans hémoglobine, plus difficilement sur la gélose ordinaire. D'ailleurs mes souches se sont comportées complètement comme celles de M. Bordet.

Quant à la pathogénéité du bacille Bordet, par rapport aux animaux, mes expériences sont d'accord avec celles de Bordet et Gengou. La tentative de produire l'endotoxine d'après la méthode de Beşredka a échoué, mais d'autre part j'ai réussi à constater l'existence de l'endotoxine par l'expérience suivante :

On a mis au repos pour se coaguler de l'exsudat péritonéal d'un cobaye tué par une injection intrapéritonéale d'un délayage épais du bacille-Bordet dans de l'eau salée à 0,9 p. 100 ; cet exsudat contenait un assez grand nombre de bacilles-Bordet; on a enlevé la substance coagulée, puis on a centrifugé. Le sérum ainsi dégagé a été aspiré au moyen d'une pipette. Le sérum était complètement clair et, examiné au microscope et en culture, il ne contenait pas de bactéries. Injecté dans le péritoine d'une souris blanche (1 cent. cube), il a provoqué la mort au bout de 24 heures. A l'autopsie on n'a trouvé qu'une quantité insignifiante de pétéchies sur le péritoine et très peu d'exsudat dans la cavité pleurale. L'exsudat péritonéal, dont la quantité était aussi insignifiante, était stérile, la séreuse non affectée. Une partie du sérum a été employée comme antigène dans une tentative de fixation du complément avec le sérum anti-Bordet. Les détails de la tentative sont indiqués ci-dessous :

1. Complément (1 + 9)	0,2 c.c.
2. Sérum de l'exsudat péritonéal (1 + 3) .	0,25 c.c.
3. Sérum anti-Bordet (1 + 49)	0,2 c.c.
4. Sérum anti-abcès (1 + 49)	0,2 c.c.
5. Ambocepteur hémolytique	0,15-100

Les chiffres en face des différents sérums indiquent la quantité du complément (sérum du cobaye 1 + 9) justement nécessaire pour l'hémolyse complète.

1 à 5 ont été laissés mélangés pendant 4 heures à la température ordinaire de la chambre, puis on a additionné de

l'ambocepteur hémolytique et du sang; le tout est resté en repos pendant 2 heures à 37°, puis on a lu le résultat de la tentative. *On a trouvé ainsi, dans le sérum dégagé de l'exsudat péritonéal coagulé, des substances spécifiques amenant la fixation du complément avec le sérum anti-Bordet* (échelle de l'hémoglobine : 5 = l'hémolyse complète, 0 = l'empêchement complet:

I — COMPLÉMENT 1 + 9	II — EXSUDAT PÉRITONÉAL 1 + 3	III — SÉRUM ANTI-BORDET 1 + 49	IV — SÉRUM ANTI-ABCÈS 1 + 49	VI — AMBOCEPTEUR 0,03 — 10	VI — SANG 5 p. 100	V — EAU SALÉE 0.9 p. 100	HÉMOLYSE
0,25 c.c.	0,0 c.c.	0,2 c c.	»	0,5 c.c.	0,5 c.c.	*ad*	2
0,25 c.c.	0,15 c.c.	0,2 c.c.	»	0,5 c.c.	0,5 c.c.	2.5 c.c.	2
0,25 c.c.	0,1 c.c.	0,2 c.c.	»	0,5 c.c.	0,5 c.c.		2
0,25 c.c.	0,05 c.c.	0,2 c.c.	»	0,5 c.c.	0,5 c.c.		4
0,25 c.c.	0,2 c.c.	»	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.		5
0,25 c.c.	0,2 c.c.	»	»	0,5 c.c.	0,5 c.c.		5
0,2 c.c.	»	0,2 c.c.	»	0,5 c.c.	0,5 c.c.		5
0,2 c.c.	»	»	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c c.		5
0,2 c.c.	»	»	»	0,5 c.c.	0,5 c.c.		5

Pour éviter l'effet des toxines qui peuvent être produites, on a injecté une culture morte lavée à l'eau salée, stérilisée dans le péritoine d'un cobaye. L'animal est mort deux jours après. A l'autopsie, on a trouvé quelques hémorragies sous-séreuses en forme de points, tandis que le péritoine était d'ailleurs lisse et miroitant. Dans la cavité péritonéale on a trouvé un peu de liquide trouble qui au microscope contenait des leucocytes et des érythrocytes. Dans la cavité pleurale, l'exsudat était jaunâtre, pur, sans éléments figurés. En culture, le sang du cœur, l'exsudat péritonéal et l'exsudat pleural se sont montrés stériles.

On n'a pas réussi à constater l'existence de toxines dans un milieu de culture de bouillon-ascite glycériné avec l'addition d'un peu d'hémoglobine. On a injecté dans le péritoine de chacun de 3 cobayes, 3 cent. cubes de cultures filtrées âgées respectivement de 2 jours, 7 jours et 15 jours, sans qu'on se

soit aperçu d'aucun effet. Une expérience semblable a été faite avec un extrait filtré de quelques cultures sur gélose-sang âgées de 4 ou 5 jours. L'extrait a été obtenu par un délayage des plaques de gélose arrosées de sang dans de l'eau salée et ensuite par centrifugation et filtration à travers des filtres de Berkefeldt. Dans cette expérience, le résultat a été aussi négatif.

De ces expériences, comparées avec les résultats des expérimentateurs précédents, il résulte que les lésions provoquées par les injections intrapéritonéales du bacille-Bordet sur les cobayes et sur les souris sont dues à un effet d'endotoxines, parce que : 1° l'émulsion de bacilles tués produit essentiellement le même effet, bien qu'un peu plus doux, que la culture vivante; 2° on trouve, mises en liberté dans le sérum provenant de l'exsudat péritonéal coagulé des cobayes morts après une injection intrapéritonéale du bacille Bordet, des substances spécifiques amenant la fixation du complément avec le sérum anti-Bordet; 3° l'effet que produit ce sérum péritonéal qui ne contient pas de bacilles est le même que celui produit par une émulsion de bacilles tués; 4° des extraits filtrés sans bacilles de cultures dans bouillon-ascite glycériné ainsi que sur gélose-sang ne produisent pas d'effets sensibles chez le cobaye, même à des doses relativement fortes.

Des tentatives pour provoquer la coqueluche expérimentale ont échoué, malgré l'emploi d'un matériel assez grand (18 jeunes chiens et 6 petits chats) et bien que ces tentatives aient été faites dans différentes circonstances.

Groupe I.

La plus grande partie des souches isolées de l'expectoration coquelucheuse appartiennent à ce groupe, c'est-à-dire les souches nos 15, 24, 28, 31, 33, 70, 72, 76, 80, 84, 85, 91, 97, 101, 102, 114 et 131, en somme 17. Les souches de ce groupe semblent correspondre essentiellement au *Bac. pertussis* Eppendorf de Jochmann et Krause.

Au sujet de la morphologie et de la teinture, ces bacilles ressemblent également au bacille de Bordet ; dans des cultures

un peu âgées ils ont pourtant une tendance au pléomorphisme, et ils forment des chaînettes et des fils courts.

Sur un milieu constitué de parties égales de bouillon peptonisé et gélosé et de sang, ces bacilles forment déjà pendant la première génération, après un repos de 24 heures à une température de 37°, des colonies d'une grandeur de 1 millimètre au plus, qui ressemblent à des gouttes de rosée; au microscope, ces colonies sont homogènes ou finement granulées; elles s'agrandissent en restant longtemps au thermostat à 37°, et elles montrent une tendance à confluer.

Dans les cultures pures la végétation est assez mince, d'une consistance dense, gris foncé, un peu opaque et hémolysante. L'hémoglobine se réduit, c'est-à-dire noircit pendant la croissance des microbes.

Sur le milieu de gélose-sang de Bordet, la culture pousse beaucoup plus péniblement que sur le milieu ci-dessus désigné.

Sur gélose-ascite, la végétation est, pendant la première génération, peu abondante, légèrement irisée; mais la culture ne se continue pas sur un milieu sans hémoglobine.

Dans du bouillon à l'hémoglobine, la culture est abondante et diffuse dans les couches supérieures du milieu; au fond du tube on trouve un dépôt un peu floconneux qui se disperse facilement. Anaérobiquement, on n'obtient qu'une végétation faible ou nulle.

Très souvent, ces bactéries perdent leur énergie de croissance; la souche s'éteint malgré plusieurs repiquages.

En tout cas, ces bacilles ont une vitalité beaucoup plus faible que celle des bacilles mentionnés plus haut. Il faut les repiquer tous les 8 jours au moins, quelquefois plus souvent, pour être sûr d'avoir une végétation.

Quelques-unes de ces souches (les n°s 76, 85, 91, 131) sont injectées — délayées dans de l'eau salée physiologique — dans les veines de quelques lapins. Leur tolérance, par rapport aux injections, a varié un peu. Quelques animaux sonts morts peu de temps après l'injection (au bout de 24 heures). A l'autopsie on n'a trouvé que quelque épanchement de sang dans les organes de l'abdomen. Le sang du cœur était stérile. Le lapin traité par la souche n° 91 a été très épuisé après la deuxième injection faite 5 jours après la première. Le sérum, pris 7 jours

après le dernier traitement, a montré un titre assez élevé pour les anticorps fixant le complément, contrairement à ce qui est autrement le cas pour le sérum des animaux traités par ces bacilles pendant si peu de temps (Wollstein).

Les cobayes se sont montrés insensibles aux injections intra-péritonéales de ces souches.

Groupe II.

1. *La souche « abcès »* a été cultivée à l'état pur d'un abcès rétropharyngé chez un enfant récemment guéri de la coqueluche; on a trouvé le bacille presque à l'état pur dans le pus évacué. Cette souche se caractérise à l'égard de la culture et de la morphologie comme appartenant au groupe de l'Influenza, l'effet qu'elle produit chez les cobayes ressemble à celui du bacille-Bordet, et le bacille s'agglutine sous l'influence du sérum anti-Bordet. Ces bacilles ont 1 μ de longueur, 1/4 μ de largeur, ils sont sveltes et immobiles, en culture pure disposés en forme de palissades; ils ne prennent pas le Gram et se colorent bien avec les couleurs ordinaires d'aniline; avec le bleu de toluidine phéniqué ils se teignent d'une couleur violette mais assez faible, le plus souvent d'une manière diffuse; quelquefois, on rencontre pourtant des exemplaires teints nettement aux extrémités, surtout dans des cultures toutes fraîches (pas encore âgées de 24 heures) et dans des milieux liquides. Ces bacilles ne forment pas de chaînettes ou de fils, et ils ne montrent aucune tendance au pléomorphisme; dans des milieux liquides ils forment souvent de petits coccobacilles courts, pour reprendre la forme originaire après être repiqués sur un milieu de gélose-sang.

Le bacille est aérobie; pourtant on obtient souvent une végétation faible, si on le cultive anaérobiquement sur gélose-sang inclinée dans des tubes de Buchner qui contiennent une solution pyrogallique alcaline.

Sur un milieu alcalin constitué de parties égales de bouillon peptonisé et gélosé et de sang, le bacille forme, déjà pendant la première génération, des colonies abondantes qui sont au commencement claires et ressemblent à des gouttes de rosée, mais

qui deviennent plus tard grisâtres et opaques. Au microscope on ne peut distinguer les jeunes colonies des colonies de l'influenza. La végétation est d'ailleurs luxuriante, gris-blanc, épaisse, un peu humide et luisante et cause une réduction forte de l'hémoglobine. La culture est un peu hémolysante.

Sur gélose-ascite le microbe s'est développé abondamment après deux ou trois réensemencements. La culture est ici gris-blanc, opalescente.

Sur le milieu ordinaire de bouillon peptonisé et gélosé la culture ne s'est pas développée.

Dans du bouillon à l'ascite, la culture a été abondante, diffuse avec un dépôt floconneux.

Sur la gélose au sang inclinée la culture a eu une forte vitalité ; un réensemencement fait au bout de six semaines a donné une riche végétation.

Injectée dans les veines d'un lapin, la culture n'a provoqué aucun symptôme morbide.

Injectée à dose forte dans le péritoine des cobayes elle a provoqué la mort au bout de 24 heures. A l'autopsie on a trouvé les mêmes altérations que celles produites par une injection du bacille-Bordet, seulement plus accentuées.

Comme on voit des recherches précédentes, il se rencontre dans l'expectoration coquelucheuse des bacilles semblables à celui de l'influenza et qui, ni à l'égard de la culture, ni à l'égard de la morphologie des jeunes cultures, ne se distinguent du bacille-Bordet.

2. *La souche n° 74* a été cultivée à l'état pur d'un malade ayant eu la coqueluche, il y avait un an, et qui est entré à l'hôpital pour la scarlatine. Dès l'entrée le malade eut quelques faibles accès de toux, surtout pendant la nuit; au bout d'une semaine les quintes devinrent typiques. Au microscope l'expectoration contenait quelques diplocoques et de petits bacilles assez nombreux teints quelquefois seulement aux extrémités, d'autres fois d'une manière diffuse, ou si on avait employé le bleu de toluidine phéniqué, d'une manière métachromatique. En culture on a trouvé surtout des streptocoques et la souche dont il s'agit ici.

Examinées au microscope, les cultures jeunes (24 heures) de

cette souche sont, quant à la morphologie et à la teinture, complètement analogues à celles du bacille-Bordet; au bout de quelques jours des grains de Babes-Ernst ont paru aux extrémités et les bacilles ont commencé d'offrir des formes d'involutions : formes en fuseau aux bouts allongés ou formes en massue; souvent ils formaient des chaînettes de 5 à 6 éléments de grands microbes enflés où seulement les contours et les extrémités sont colorés tandis que la forme est celle du type originaire; peu à peu la culture prend microscopiquement un aspect qui ne correspond nullement à celui de la culture originaire. Après être repiqué sur un milieu frais, le bacille prend de nouveau sa forme primitive.

Le bacille est d'ailleurs rigoureusement aérobie, immobile et demande nécessairement la présence du sang.

Sur un milieu de parties égales de bouillon peptonisé et gélosé et de sang, le bacille forme des colonies fines, fortement luisantes qui au microscope sont rondes, plutôt homogènes et fortement réfringentes; les colonies n'ont aucune tendance à confluer. La croissance se fait lentement. Après un séjour de 2 ou 3 jours au thermostat à 37° il se forme, — si la semence a été abondante, — un voile mince, grisâtre et diaphane, quelquefois finement granuleux dont l'étendue n'augmente pas. Sur un milieu humide la culture est plutôt d'une consistance épaisse, mais elle dessèche rapidement et devient solide, adhérente au milieu, de sorte qu'on ne peut la prélever sans emmener aussi la couche supérieure du milieu. La culture est légèrement hémolysante et ne réduit pas l'hémoglobine. Quant à l'aspect la culture rappelle beaucoup celle du bacille-Bordet sur un milieu de gélose arrosée de sang humain, tandis que cette dernière culture est plus blanche et bien plus abondante sur de la gélose arrosée de sang de lapin.

Sur le milieu de gélose-sang de Bordet la culture est beaucoup moins abondante que sur le milieu ci-dessus nommé.

Sur un milieu de gélose-sang inclinée avec de l'eau de condensation en abondance, la culture reste plus épaisse, la végétation devient plus abondante et elle se laisse prélever plus facilement du milieu.

Dans du bouillon à l'hémoglobine, la culture est diffuse dans les couches supérieures du milieu avec un dépôt floconneux

qui se disperse facilement. Une addition de liquide d'ascite rend la culture plus riche. La réaction du substratum ne se change pas..

Sur un milieu de gélose-sang inclinée, laissé à la température ordinaire du laboratoire, la culture peut vivre pendant un mois à peu près.

Une injection intraveineuse d'un délayage dans une solution d'eau salée à 0,9 p. 100 a été bien supportée par les lapins et n'a pas causé d'amaigrissement.

Une injection intrapéritonéale de la culture sur des cobayes n'a pas provoqué de symptômes morbides.

La présence de toxines dans la culture filtrée n'a pas été constatée.

Les méthodes sérologiques, essayées comme moyens de différenciation des espèces de bactéries mentionnées ci-dessus, sont la méthode de la fixation du complément et l'agglutination. Les microbes qu'on a examinés sérologiquement sont le bacille Bordet, la souche n° 74, la souche « abcès » et, parmi les autres bacilles ressemblant au microbe de l'influenza, les souches n°s 76, 85, 91 et 131 qui, en culture et au microscope, semblaient identiques; d'ailleurs on a examiné aussi une souche de l'influenza cultivée à l'état pur d'un cas de rougeole.

Quant aux détails techniques de la pratique des réactions de fixation, il faut consulter le chapitre suivant.

Les différents sérums antimicrobiens se préparent par une injection intraveineuse, sur des lapins, d'une émulsion de culture poussée sur gélose-sang, dans de l'eau salée physiologique. En préparant les sérums antimicrobiens on a spécialement pris en considération leur contenu d'anticorps qui provoquent la fixation du complément; leur titre dans le sérum, ainsi que la tolérance de l'animal à l'égard des injections, ont décidé du moment de la suspension du traitement.

Les résultats des expériences sont cités dans le tableau I. Les réactions positives avec la souche homologue sont en chiffres gras, tandis que les réactions positives avec les souches hétérologues sont en chiffres italiques (échelle de l'hémoglobine : 5 = l'hémolyse complète, 0 = l'empêchement complet).

TABLEAU I.

Titrage des anticorps fixant le complément.

DILUTION du SÉRUM	SOUCHE								CONTROLE du SÉRUM
	Bordet	74	91	85	131	76	abcès	rougeole	
				Sérum anti-Bordet.					
1 : 10	**1**	1	1	1	1	2	1	1	2
1 : 20	**1**	2	2	1	1	3	3	1	4
1 : 50	**1**	1	4	5	4	5	3	4	5
1 : 100	**1**	2	5	5	4	5	5	5	5
1 : 200	**1**	5	5	5	5	5	5	5	5
1 : 400	**3**	5	5	5	5	5	5	5	5
1 : 500	5	5	5	5	5	5	5	5	5
				Sérum anti-74.					
1 : 10	2	**1**	4	4	4	3	4	4	4
1 : 20	2	**1**	5	4	5	5	5	4	5
1 : 50	3	**1**	5	5	5	5	5	5	5
1 : 100	4	**1**	5	5	5	5	5	5	5
1 : 200	5	**3**	5	5	5	5	5	5	5
1 : 400	5	4	5	5	5	5	5	5	5
1 : 500	5	5	5	5	5	5	5	5	5
				Sérum anti-91.					
1 : 10	3	4	**1**	1	1	2	4	3	4
1 : 20	3	5	**1**	1	1	2	4	4	4
1 : 50	5	5	**2**	1	3	5	5	4	5
1 : 100	4	5	**3**	3	3	5	5	5	5
1 : 200	5	5	5	4	4	5	5	5	5
1 : 400	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1 : 500	5	5	5	5	5	5	5	5	5
				Sérum anti-131.					
1 : 10	1	2	2	2	**2**	1	5	1	4
1 : 20	2	3	4	3	**2**	3	5	2	5
1 : 50	3	5	5	3	**3**	5	5	4	5
1 : 100	4	5	5	5	5	5	5	5	5
1 : 200	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1 : 400	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1 : 500	5	5	5	5	5	5	5	5	5

DILUTION du SÉRUM	SOUCHE Bordet	74	91	85	131	76	abcès	rougeole	CONTROLE du SÉRUM
Sérum anti-76.									
1 : 10	4	1	2	2	2	**1**	3	5	4
1 : 20	4	4	3	4	3	**1**	5	5	5
1 : 50	4	5	5	4	3	**1**	5	5	5
1 : 100	4	5	5	5	5	**1**	5	5	5
1 : 200	5	5	5	5	5	**3**	5	5	5
1 : 400	5	5	5	5	5	4	5	5	5
1 : 500	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Sérum anti « Abcès ».									
1 : 10	3	4	4	4	2	3	**1**	4	4
1 : 20	5	5	4	5	4	2	**2**	5	5
1 : 50	5	5	4	4	4	5	**1**	5	5
1 : 100	5	5	5	5	5	5	**1**	5	5
1 : 200	5	5	5	5	5	5	**2**	5	5
1 : 400	5	5	5	5	5	5	**3**	5	5
1 : 500	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Sérum anti « Rougeole ».									
1 : 10	2	3	3	3	3	2	5	**1**	5
1 : 20	3	4	4	5	3	3	5	**2**	5
1 : 50	3	5	5	4	4	5	4	4	5
1 : 100	4	5	5	5	5	5	5	4	5
1 : 200	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1 : 400	5	5	5	5	5	5	5	3	5
1 : 500	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Titrage des agglutinines.

SÉRUM antimicrobien	SOUCHE Bordet	74	abcès	91	85	rougeole
Bordet	10.000 **20.000** ?	0	400	0	25	0
74	25	**10.000**	0	0	0	50
Abcès	0	0	**10.000**	0	0	0
91	0	0	0	**400**	400	0
131	800	0	0	25	0	50
76	0	0	0	0	50	0
Rougeole	0	0	0	0	0	**1 000**

Les titres de l'agglutination avec la souche homologue sont indiqués en chiffres gras.

Les expériences ont été faites avec une quantité constante de l'antigène et des quantités décroissantes des sérums antimicrobiens. Outre le titrage du complément et de l'ambocepteur hémolytique, on a fait dans les expériences préliminaires le titrage de l'action anticomplémentaire des antigènes employés dans l'expérience définitive. Dans l'expérience définitive on a fait aussi le contrôle du complément, de l'antigène et du sérum. Comme système hémolytique on a employé des globules de sang de mouton, de l'ambocepteur de lapin, du complément de cobaye. Les antigènes employés ont été des cultures sur gélose-sang, âgées de 48 heures, délayées dans de l'eau salée physiologique et centrifugées pour rendre les délayages aussi homogènes que possible. Les cultures sont prélevées du milieu en raclant la gélose sans en entamer la surface. La quantité totale des liquides employés dans les expériences a été 2 c. c. 5 dont 0 c. c. 2 d'antigène, 0 c. c. 2 de dilution de sérum antimicrobien, 0 c. c. 5 de délayage de globules de mouton à 5 p. 100 et 0 c. c. 5 de dilution d'ambocepteur hémolytique. La durée de la fixation a été de 4 heures à la température ordinaire de la chambre, ainsi que Bordet l'a indiqué pour la constatation de l'existence, dans le sérum des convalescents de la coqueluche, d'anticorps amenant la fixation du complément et correspondant au bacille-Bordet; après l'addition de l'ambocepteur hémolytique et de l'émulsion du sang, le mélange a été laissé pendant 2 heures à une température de 37°, puis centrifugation et lecture faite en comparant avec une échelle de l'hémoglobine correspondante à celle indiquée par Boas pour la réaction de Wassermann; j'ai pourtant choisi d'autres désignations, c'est-à-dire 5 correspondant au 100 de Boas, 4 au 80, 3 au 60, 2 au 40, et 1 au 20. Pour les deux souches n° 76 et n° 131, on n'a pas pu se servir de l'épreuve de l'agglutination à cause de l'agglutination spontanée de celles-ci.

Par le résultat de ces expériences on a réussi à distinguer sérologiquement entre la plupart des souches examinées; seulement les n°s 85 et 91 se sont montrés identiques quant à la microscopie, à la culture et à la biologie.

La souche n° 131 a été plus difficile à déterminer ; comme elle agglutinait spontanément on ne pouvait l'employer dans des tentatives d'agglutination, tandis qu'au titrage des anti-

corps fixant le complément dans le sérum anti-91, elle a donné le même résultat que la souche homologue et la souche n° 85. Le sérum anti-131 a montré le même titre pour les anticorps, fixant le complément avec la souche homologue, la souche n° 85 et le bacille-Bordet; ceci s'est répété en partie dans la tentative de l'agglutination avec ce même sérum antimicrobien, ce dernier agglutinant, dilué jusqu'à 1-800, le bacille-Bordet, dilué jusqu'à 1-25, la souche n° 91, tandis que la souche n° 85 ne s'est pas agglutinée. D'après ces résultats, on peut difficilement supposer que la souche n° 131 soit identique aux souches n°s 91 et 85; elle se distingue du bacille-Bordet non seulement en culture, mais aussi sérologiquement, le sérum anti-Bordet ne montrant avec cette souche qu'un titre très bas pour les anticorps fixant le complément, tandis qu'avec la souche homologue ce titre était assez élevé.

Une série semblable de recherches a été faite par Odaira: dans ses tentatives d'agglutination et de fixation du complément, le bacille-Bordet s'est distingué également de plusieurs autres bacilles du groupe de l'influenza; mais, tandis que dans les tentatives d'Odaira la méthode de la fixation du complément et l'épreuve de l'agglutination ont montré à peu près la même spécificité, la spécificité a été dans mes tentatives beaucoup plus quantitative pour les anticorps fixant le complément que pour les agglutinines. Au titrage des anticorps fixant le complément dans les différents sérums antimicrobiens avec les souches de microbes ci-dessus nommées comme antigènes, le résultat a été une réaction de groupes dans les concentrations fortes de sérum, et, seulement dans les concentrations faibles de sérum, une réaction spécifique; avec les sérums ayant le titre bas, le résultat du titrage a été aussi une réaction de groupes, de sorte que la réaction de la fixation du complément était, dans de tels cas, à peu près sans valeur comme méthode de différenciation, les titres étant presque les mêmes pour les anticorps spécifiques que pour les anticorps communs.

L'agglutination a donné ainsi un résultat plus spécifique que la réaction de la fixation du complément, mais il faut se souvenir que Bordet a démontré que les bacilles-Bordet de la même souche, mais cultivés partie sur un milieu arrosé de sang, partie sur un milieu non arrosé de sang se sont montrés

biologiquement différents quant à l'agglutination — le sérum antimicrobien préparé avec des bacilles cultivés sur un milieu au sang n'agglutinant pas les bacilles cultivés sur un milieu de gélose-ascite et inversement — tandis que les anticorps amenant la fixation du complément étaient les mêmes pour les deux sortes de culture. La réaction de fixation peut former ainsi quelquefois un supplément nécessaire à l'épreuve de l'agglutination.

On peut donc rencontrer dans l'expectoration de la coqueluche différentes espèces de bacilles ovoïdes ressemblant à celui de l'Influenza et qui, au sujet de la morphologie et de la teinture, ne se distinguent pas avec certitude les uns des autres; au sujet de la culture on distingue plusieurs groupes dans lesquels on peut différencier sérologiquement plusieurs espèces. Le bacille-Bordet est une de ces espèces; par ses réactions sérologiques il se distingue nettement des autres bacilles, tandis qu'il n'est spécifique ni au sujet de la morphologie, de la teinture et de la culture, ni au sujet de l'effet que produisent ses toxines chez les cobayes.

Comme résultat définitif de ces recherches, il résulte que le bacille-Bordet, pour ce qui concerne la culture et la teinture, se distingue nettement de la plupart des souches examinées de l'Influenza. Pourtant j'ai trouvé quelques souches qui formaient, pour ainsi dire, la transition de l'un de ces deux groupes à l'autre. La souche n° 74 s'est montrée au sujet de la culture et de la teinture presque analogue au bacille-Bordet, tandis que dans les expériences sérologiques il s'est constaté entre eux une différence nette, mais pourtant cette souche s'approchait plus du bacille-Bordet que les autres souches de l'Influenza, même à l'égard de la sérologie. C'est le contraire pour la souche « Abcès »; celle-ci s'est distinguée en culture nettement du bacille-Bordet et dans les tentatives de la fixation du complément elle a montré également une différence nette; par contre, elle s'est agglutinée assez fortement sous l'influence du sérum anti-Bordet, de même qu'elle s'est comportée complètement comme le bacille-Bordet à l'égard de la pathogénité par rapport aux animaux, contrastant ainsi avec les autres souches de l'Influenza.

II

RECHERCHES SÉROLOGIQUES CLINIQUES

I. — *Recherches sur la présence d'anticorps amenant la fixation du complément dans le sang de convalescents de la coqueluche et de malades qui, d'après les renseignements fournis, ont été ou n'ont pas été atteints de la coqueluche ; le bacille-Bordet ou d'autres bacilles semblables à ceux de l'Influenza, qui ont été cultivés à l'état pur de l'expectoration coquelucheuse, ont servi d'antigène.*

Comme nous avons déjà dit, on n'a fait que très peu de ces recherches, et les résultats de celles-ci ont beaucoup varié. On pourrait attribuer ces variations aux différences de la méthode technique. Toutes les expériences dont on a indiqué la technique sont faites d'après les indications de Bordet avec une culture de microbes délayée dans de l'eau salée comme antigène et avec une durée de fixation de 4 heures à la température ordinaire du laboratoire ; les quantités de complément qu'on a employées ont un peu varié et ne semblent pas être dues au résultat d'un titrage exact. Bächer et Menschikoff, ainsi que Weil et Netter, ont fait le titrage du complément ; les premiers de ces auteurs l'ont employé en quantité de 2 fois la dose amenant justement l'hémolyse complète; le résultat négatif de ces expériences (27 sérums qui ont donné tous un résultat négatif) pourrait être dû ainsi à un excès de complément. Poleff a employé une émulsion microbienne fortement diluée pour neutraliser son action anticomplémentaire, ce qui pourrait aussi avoir de l'influence sur le résultat de la réaction.

Dans mes expériences hémolytiques, j'ai employé une émulsion à 5 p. 100 de globules de mouton lavés, de l'ambocepteur de lapin et du complément de cobaye. Comme l'a indiqué Boas pour la réaction de Wassermann, le complément, l'ambocepteur hémolytique ainsi que l'action anticomplémentaire de l'antigène ont été titrés avant chaque expérience.

La préparation de l'émulsion microbienne peut offrir quelques difficultés, l'émulsion ayant souvent toute seule un

pouvoir empêchant. Dans de tels cas l'émulsion ne peut être employée que tellement diluée qu'elle devient inapplicable comme antigène; surtout les émulsions préparées comme l'a indiqué Bordet, par un lavage à l'eau salée de cultures poussées sur gélose-sang inclinée et âgées de 2 à 3 jours, se sont montrées souvent fortement anticomplémentaires. Les émulsions se préparent le mieux en raclant des cultures développées sur gélose-sang dans des boîtes de Petri et âgées de 2 à 3 jours. Il faut que la culture soit abondante et si humide qu'elle se détache facilement de la surface du milieu quand on la prélève. La culture prélevée, qui doit être plutôt d'une couleur blanche pure et qui autant que possible ne doit pas contenir de particules du milieu nutritif, est délayée dans de l'eau physiologique, de sorte qu'il se forme une émulsion épaisse, autant que possible homogène; on centrifuge celle-ci pour en séparer les flocons, etc; l'émulsion homogène préparée comme ci-dessus est aspirée au moyen d'une pipette et diluée jusqu'à l'opacité convenable. Dans mes expériences j'ai employé une émulsion dont l'opacité correspond à celle d'une dilution de lait à 1 : 200. Cette mesure est assez inexacte et se fait trop au jugé, mais elle est facile à employer et elle est utilisable. Une émulsion préparée de cette manière aura le plus souvent un pouvoir empêchant, mais celui-ci est pourtant assez limité; à la dose employée de 0 c. c. 2 l'action anti-complémentaire correspondait à environ 0 c.c. 005 à 0 c.c. 01 de complément. Pour juger de la plus faible richesse de l'émulsion avec laquelle il soit possible de travailler, si on veut avoir une réaction nette, j'ai tenté des émulsions de différentes concentrations vis-à-vis de l'immunsérum. Ce sérum a été employé dans une dilution qui s'approchait de la limite inférieure du titre, parce que pratiquement il s'agit surtout de juger de la plus faible richesse qu'on puisse donner à une émulsion microbienne pour avoir une réaction nette, avec un sérum contenant peu d'anticorps fixant le complément. Dans toutes mes expériences j'ai employé 0 c.c. 2 d'émulsion microbienne et 0 c.c. 1 de dilution de l'immunsérum. L'épaisseur des émulsions microbiennes correspondait à une dilution dans le lait à 1 : 200, 1 : 400, 1 : 600. Le résultat a été ce qui suit :

DILUTION DE L'IMMUNSÉRUM 1 : 100		DILUTION DE L'IMMUNSÉRUM 1 : 200	
CONCENTRATION de L'ÉMULSION	HÉMOLYSE	CONCENTRATION de L'ÉMULSION	HÉMOLYSE
—	—	—	—
1 : 200	45	1 : 200	60
1 : 400	100	1 : 400	100
1 : 600	100	1 : 600	100

L'hémolyse a été déterminée d'après une échelle d'hémoglobine correspondante à celle indiquée par Boas pour la réaction de Wassermann (100 = hémolyse complète, 0 = empêchement complet). C'est en vertu de ceci que j'ai choisi pour mes expériences l'émulsion de 1 : 200, cette émulsion ne montrant qu'une action anticomplémentaire insignifiante ou nulle, en même temps qu'elle était suffisamment sensible vis-à-vis de l'immunsérum.

Le temps qu'il faut employer, pour que la combinaison du complément, des anticorps et de l'antigène se fasse, est indiqué par Bordet de 4 heures à la température ordinaire du laboratoire. Dans mes expériences j'ai suivi cette indication qui est celle qu'on suit, en général, dans des recherches de cette sorte. Pour examiner pourtant la possibilité d'une réaction plus forte en laissant la combinaison se faire tantôt à la température du laboratoire, tantôt à 37°, j'ai fait quelques expériences employant les durées de fixation et les températures ci-dessous précisées :

I.	0 heure	à la chaleur ordinaire du laboratoire	1 heure à 37°
II.	1 heure		1 heure à 37°
III.	2 heures		1 heure à 37°
IV.	3 heures		1 heure à 37°
V.	4 heures		0 heure à 37°

Le résultat a été :

IMMUNSÉRUM 0,05 — 10	I	II	III	IV	V
Dont : 0 c.c. 2	10	10	10	10	10
— 0 c.c. 15	10	15	10	10	10
— 0 c.c. 1	45	35	20	20	35
— 0 c.c. 0,05	90	90	80	80	80
Contrôle du complément	100	100	100	90	100
Contrôle de l'antigène	100	100	100	100	100
Contrôle du sérum	100	100	100	100	100

Une autre expérience avec une autre sorte d'immunsérum, mais pratiquée d'ailleurs comme celle nommée ci-dessus, a montré :

IMMUNSÉRUM 0,05 — 10	I	II	III	IV	V
Dont : 0 c.c. 5	80	55	50	55	60
— 0 c.c. 025	80	90	70	70	70
— 0 c.c. 01	100	100	100	80	100
Contrôle du complément	100	100	100	100	90
Contrôle de l'antigène	100	100	100	100	100
Contrôle du sérum	100	100	100	100	100

Il apparaît ainsi que les expériences désignées sous III, IV et V ont donné à peu près les mêmes résultats, tandis que les résultats sous II ont été plutôt plus faibles et ceux sous I absolument plus faibles que les autres. J'ai donc choisi la technique de Bordet.

La méthode employée pour toutes les réactions de la fixation du complément mentionnées dans la suite a donc été celle de l'exemple suivant :

Expérience préliminaire I : **Titrage du complément.**

COMPLÉMENT 1 + 9	EAU SALÉE 0,9	AMBOCEPTEUR 0,6 — 100	SANG 5 p. 100	HÉMOLYSE
0,35 c.c.	1,15 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	100
0,3 c.c.	1,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	100
0,25 c.c.	1,25 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	100
0,2 c.c.	1,3 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	80
0,15 c.c.	1,35 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	45

Le complément et l'eau salée mélangés sont laissés pendant 4 heures à la température ordinaire de la chambre ; on ajoute l'ambocepteur et le sang, et le tout est abandonné au repos pendant 1 heure à 37° ; puis on fait la lecture :

Expérience préliminaire II : **Titrage du pouvoir empêchant de l'antigène.**

COMPLÉMENT 1 + 9	EAU SALÉE 0,9	ANTIGÈNE	AMBOCEPTEUR 0,6 — 100	SANG 5 p. 100	HÉMOLYSE
0,5 c.c.	0,8 c.c.	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	100
0,45 c.c.	0,85 c.c.	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	100
0,4 c.c.	0,9 c.c.	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	100
0,35 c.c.	0,95 c.c.	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	100
0,3 c.c.	1,00 c.c.	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	90
0,25 c.c.	1,05 c.c.	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	60

Le complément + l'eau salée + l'antigène restent mélangés pendant 4 heures à la température ordinaire de la chambre, d'ailleurs comme dans l'expérience I.

Expérience préliminaire III : **Titrage de l'ambocepteur.**

COMPLÉMENT 1 + 9	EAU SALÉE 0,9	AMBOCEPTEUR 0,3 — 100	SANG 5 p. 100	HÉMOLYSE
0,5 c.c.	1,0 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	100
0,5 c.c.	1,1 c.c.	0,4 c.c.	0,5 c.c.	90
0,5 c.c.	1,2 c.c.	0,3 c.c.	0,5 c.c.	40

Le mélange est laissé au repos pendant 1 heure à 37°.

Expérience définitive (**avec 6 sortes de différents sérums de malades et 1 immunsérum spécifique**) : *on emploie, comme antigène, une émulsion de bacille-Bordet.*

T (1 + 9)	EAU SALÉE 0,9 p. 100	SÉRUM de malades INACTIF	ANTIGÈNE	AMBOCEPTEUR 0,6 — 100	SANG 5 p. 100	HÉMOLYSE
0,35 c.c.	0,75 c.c.	0,2I	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	5
0,35 c.c.	0,75 c.c.	0,2II	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	1
0,35 c.c.	0,75 c.c	0,2III	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	5
0,35 c.c.	0,75 c.c.	0,2IV	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	4
0,35 c.c.	0,75 c.c.	0,2V	0,2 c.c.	0,5 c.c	0,5 c.c.	5
0,35 c.c.	0,75 c.c.	0,2VI	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	1
0,35 c.c.	0,75 c.c.	0,2VII	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	5
0,35 c.c.	0,75 c.c.	0,2VIII	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	1
0,35 c.c.	0,75 c.c.	0 2Immuns	0,2 c.c.	0,5 c.c.	0,5 c.c.	0
0,25 c.c.	1,05 c.c.	0,2I—VIII—Imm.		0,5 c.c.	0,5 c.c.	5
				0,5 c.c.		(Sér. III et IV 4—5)
0,25 c.c.	1,25 c.c.			0,5 c.c.	0,5 c.c.	5
0,35 c.c.	0,95 c.c.		0,2 c.c.		0,5 c.c.	5

On laisse reposer le complément + l'eau salée + le sérum de malades + l'antigène, le tout mélangé, pendant 4 heures à la température ordinaire de la chambre; puis on ajoute l'ambocepteur hémolytique et la suspension du sang et on laisse le mélange 2 heures à 37°; au bout de ces 2 heures on centrifuge et on détermine le degré de l'hémolyse en comparant avec une échelle de l'hémoglobine qui correspond complètement à celle employée par Boas pour déterminer la réaction de Wassermann. Pour faciliter la connaissance des résultats des expériences, j'ai employé d'autres désignations, à savoir les chiffres : 5, 4, 3, 2, 1, 0 correspondant à 100, 80, 60, 40, 20 de l'échelle de Boas; de cette manière la lecture devient un peu moins détaillée, mais pourtant assez exacte pour des expériences de cette sorte. La limite entre la réaction positive et la réaction négative est placée entre l'hémolyse 3 et 4, de sorte que les chiffres 3, 2, 1, 0 indiquent la réaction positive, et les chiffres 4, 5 la réaction négative, l'empêchement 4 pouvant se voir quelquefois avec le sérum de malades qui n'ont pas eu la coqueluche et aussi dans les tubes de contrôle, peut-être à cause d'erreurs dans les expériences.

Le sérum de malades employé est rendu inactif par le chauffage à 56° pendant une demi-heure.

Le contrôle a été obtenu par : 1° la répétition de l'expérience préliminaire I avec la dose la plus faible du complément qui puisse amener l'hémolyse complète, pour être sûr que le système hémolytique soit en ordre; 2° le contrôle de l'antigène pour se garantir d'un empêchement possible de l'hémolyse par l'antigène seul; 3° le contrôle du sérum pour être sûr que la dose employée du sérum de malade ne puisse amener elle seule l'empêchement de l'hémolyse; il faut que ces trois tubes de contrôle marquent tous l'hémolyse 5 (l'hémolyse complète); 4° une expérience de fixation faite avec un tube qui au lieu du sérum de malade contient de l'immunsérum spécifique; il faut que ce tube marque un empêchement de l'hémolyse. Autant que possible on a d'ailleurs examiné en même temps le sérum de malades atteints et celui de malades non atteints de la coqueluche.

Dans l'exemple mentionné ci-dessus, les résultats ont été ceux qui suivent :

Sérum de malade. — N° I. I... J..., deux ans, entré à l'hôpital le 12 novembre 1913; cas de contrôle n° 9 (tableau III). Scarlatine sans complications pendant 4 semaines. Pas de coqueluche; réaction de fixation négative avec le bacille-Bordet.

Sérum de malade. — N° II. E... H...., cinq ans, entré le 12 novembre 1913; n° 106 (tableau II). Coqueluche au 2e mois compliquée de pneumonie. Réaction de fixation positive avec le bacille-Bordet.

Sérum de malade. — N° III. P... J..., quatre mois, entré le 23 novembre 1913; n° 102 (tableau II). Coqueluche à la 2e semaine du stade convulsif. Réaction de fixation négative avec le bacille-Bordet.

Sérum de malade. — N° IV. R... H..., vingt et un mois, entré le 4 novembre 1913; cas de contrôle n° 10 (tableau III). Scarlatine (?) à la 5e semaine; pas de coqueluche. Réaction de fixation négative avec le bacille-Bordet.

Sérum de malade. — N° V. C... S..., quatre ans et demi; entré le 10 novembre 1913; cas de contrôle n° 11 (tableau III). Scarlatine à la 5e semaine. Pas de coqueluche. Réaction de fixation négative avec le bacille-Bordet.

Sérum de malade. — N° VI. Fr... L..., six mois; entré le 18 novembre, n° 101 (tableau II). Coqueluche à la 3e semaine du stade convulsif compliquée de gastro-entérite. Réaction de fixation positive avec le bacille-Bordet.

Sérum de malade. — N° VII. Non baptisé, six mois (sorti de l'hôpital municipal, service III, le 6 décembre 1913), n° 38 (tableau II). Coqueluche au début. Réaction de fixation négative avec le bacille-Bordet.

Sérum de malade. — N° VIII. E... F..., deux ans, entré le 11 octobre 1913, n° 105 (tableau II). Coqueluche au 3e mois du stade convulsif compliquée de tuberculose. Réaction de fixation positive avec le bacille-Bordet.

Dans ces expériences il s'est donc montré que le sérum de trois malades atteints de la scarlatine, et qui, d'après les renseignements fournis, n'avaient pas eu la coqueluche, n'a amené aucun empêchement de l'hémolyse avec le bacille-Bordet comme antigène, tandis que, sur 5 malades atteints de la coqueluche, le sérum des trois a amené cet empêchement.

Comme aucun des malades examinés, d'après les renseignements fournis et d'après l'examen à la clinique, n'a été suspect de la syphilis, le fait que le sérum syphilitique combiné à l'antigène microbien peut provoquer un empêchement non spécifique de l'hémolyse, n'a eu aucune influence sur les réactions faites par moi avec le sérum coquelucheux; parmi les cas de contrôle il y a un seul malade ayant la syphilis congénitale, il a donné une réaction de Wassermann négative (renseignement fourni de l'hôpital Rudolph-Berg), et il n'a pas provoqué d'empêchement de l'hémolyse avec le bacille-Bordet comme antigène.

Une cause d'erreur semblable pourrait exister dans la scarlatine où la réaction positive de Wassermann peut, comme on le sait, se rencontrer sans qu'il s'agisse de la syphilis. Comme il résulte des essais de contrôle, cette possibilité n'est que faible, les réactions positives qu'on y a trouvées étant isolées, ce qui correspond à peu près à ce qui a lieu dans la diphtérie où cette cause d'erreur n'existe pas (voyez le tableau III).

Les résultats des réactions de la fixation du complément avec le sérum de malades qui ont ou qui ont eu la coqueluche, et avec une suspension dans de l'eau salée du bacille-Bordet comme antigène, sont cités dans le tableau II dans lequel les malades, par rapport au stade de la maladie, sont rangés dans l'ordre chronologique; dans le cas où le même malade a été examiné plusieurs fois, les résultats de ces examens sont réunis dans une colonne de côté en face du premier examen.

TABLEAU II

Résultats des expériences de la fixation du complément avec le sérum des malades qui sont ou qui ont été atteints de la coqueluche, et avec le bacille-Bordet comme antigène.

Nos	COMPLICATIONS	PÉRIODE du STADE CONVULSIF	Hémolyse	EXAMEN RÉPÉTÉ	
				Période	Hémolyse.
97	—	1 semaine.	5		
38	—	1 semaine.	5		
89	—	1 semaine.	5		
				3 semaines.	3
				4 semaines.	2
102	—	2 semaines.	5		
		2 semaines.	5		
				3 semaines.	0
101	Gastro-entérite	2 semaines.	5		
				3 semaines.	1
				4 semaines.	0
133	Catarrhe intestinal . . .	2 semaines.	4		
				3 semaines.	4
				5 semaines.	0
93	—	2 semaines.	3		
				4 semaines.	3
				5 semaines.	0
69	Catarrhe intestinal . . .	3 semaines.	4		
				4 semaines.	2
				5 semaines.	2

Nos	COMPLICATIONS	PÉRIODE du STADE CONVULSIF	Hémo-lyse	EXAMEN RÉPÉTÉ	
				Période	Hémolyse
89		3 semaines.	3		
102		3 semaines.	0		
101		3 semaines.	1		
133		3 semaines.	4		
92	Pneumonie	3 semaines.	2		
				4 semaines.	5
107	Spondylite	3 semaines.	3		
84	Pneumonie	3 semaines.	3		
131	Pneumonie	3 semaines.	1		
				3 mois.	4
90	Bronchite. Eclampsie .	3 semaines.	2		
91	Rougeole	3 semaines.	0		
132	Eclampsie	3 semaines.	2		
89	—	4 semaines.	2		
101		4 semaines.	0		
93		4 semaines.	3		
69		4 semaines.	2		
92		4 semaines.	5		
103	Bronchite capillaire . .	4 semaines.	1		
80	—	4 semaines.	1		
120	—	4 semaines.	3		
59	Eclampsie. Pneumonie .	4 semaines.	5		
104	—	4 semaines.	1		
133		5 semaines.	0		
93		5 semaines.	0		
69		5 semaines.	2		
127	Eclampsie	5 semaines.	1		
15	Eclampsie. Pneumonie .	5 semaines.	3		
16	Pneumonie	5 semaines.	1		
123	Pneumonie	5 semaines.	1		
	Hémiplégie			2 mois.	1
47	—	5 semaines.	1		
7	Pneumonie	5 semaines.	2		
	Eclampsie				
121	—	5 mois	1		
70	—	2 mois.	2		
123	—	2 mois.	1		
129	Bronchite + D. B. (*) . .	2 mois.	3		
106	Pneumonie	2 mois.	2		
		2 mois.	1		
6	Gastro-entérite	2 mois.	1		
114	Scarlatine	2 mois.	0		
111	Scarlatine	2 mois.	1		
18	—	2 mois.	1		
105	Tuberculose	2 mois.	1		
				3 mois.	1
				4 mois.	1
130	Rougeole	2 mois.	0		
51	Rougeole	3 mois.	0		
105		3 mois.	1		
131		3 mois.	4		
13	—	3 mois.	2		
104	Laryngite	3 mois.	0		
116	—	3 mois.	1		
98	Rougeole	3 mois.	5		

(*) D. B. = Bacille de la diphtérie.

Nos	COMPLICATIONS	PÉRIODE du STADE CONVULSIF	Hémolyse	EXAMEN RÉPÉTÉ	
				Période	Hémolyse
85	Rougeole	3 mois.	5		
106	Rougeole	3 mois.	2		
	Pneumonie	3 mois.	3		
112	Rougeole	3 mois.	2		
99	Scarlatine	3 mois.	2		
44	Scarlatine	3 mois.	2		
86	Pneumonie	3 mois.	0		
124	Scarlatine	3 mois.	2		
			3		
105		4 mois.	1		
116	Rougeole	4 mois.	2		
117	Rougeole	4 mois.	3		
96	—	5 mois.	2		
95	Pneumonie	5 mois.	3		
				6 mois.	5
119	Rougeole	5 mois.	3		
49	Diph. fauc.	5 mois.	0		
95		6 mois. (1 semaine de récidive)	5		
74	Rougeole	18 mois.	2		
108	Rougeole	18 mois.	5		
113	Rougeole	18 mois.	1		
114	Rougeole	18 mois.	4		
52	Rougeole	1 à 2 ans.	0		
21	Diph. laryng	1 à 2 ans.	4		
14	Diph. laryng	1 à 2 ans.	2		
44	Scarlatine	1 à 2 ans.	4		
78	Diph. fauc.	2 à 3 ans.	0		
101	Diph. fauc.	2 à 3 ans.	3		
34	Scarlatine	2 à 3 ans.	4		
57	Scarlatine	2 à 3 ans.	3		
62	Scarlatine	2 à 3 ans.	2		
79	Scarlatine	2 à 3 ans.	4		
111	Rougeole	2 à 3 ans.	3		
100	Diph. fauc.	2 à 3 ans.	3		
64	Scarlatine	3 à 4 ans.	3		
54	Scarlatine	3 à 4 ans.	0		
35	Scarlatine	3 à 4 ans.	5		
63	Scarlatine	3 à 4 ans	5		
56	Scarlatine	3 à 4 ans.	3		
53	Scarlatine	4 à 5 ans.	0		
109	Rougeole	4 à 5 ans.	4		
28	Diph. fauc.	4 à 5 ans.	2		
110	Rougeole	5 à 6 ans.	4		
27	Diph. fauc.	6 à 7 ans.	4		
32	Diph. fauc.	6 à 7 ans.	2		
37	Scarlatine	6 à 7 ans.	4		
100	Scarlatine	Guéri.	3		
61	Rougeole	Guéri.	3		
55	Rougeole	Guéri.	0		
87	Rougeole	Guéri.	2		

N^os	AGE (ans)	COMPLICATIONS	PÉRIODE du STADE CONVULSIF	Hémolyse	EXAMEN RÉPÉTÉ	
					Période	Hémolyse
22	17	Diph. fauc.	Plusieurs années.	2		
23	5	Diph. fauc.	*Id.*	3		
49	7	Diph. fauc.	*Id.*	4		
76	10	Diph. fauc.	*Id.*	1		
48	12	Diph. fauc.	*Id.*	3		
77	4	Diph. fauc.	*Id.*	5		
72	6	Diph. fauc. gravis.	*Id.*	5		
66	4	Diph. laryng.	*Id.*	2		
42	2	Scarlatine.	*Id.*	2		
41	8	Scarlatine.	*Id.*	3		
46	7	Scarlatine.	*Id.*	5		
43	6	Scarlatine.	*Id.*	5		
40	5	Scarlatine.	*Id.*	2		
39	10	Scarlatine.	*Id.*	3		
118	5	Diph. gravis.	*Id.*	5		
73	10	Rougeole.	*Id.*	0		

TABLEAU III.

Cas de Contrôle.

MALADES QUI, D'APRÈS LES RENSEIGNEMENTS FOURNIS, N'ONT PAS EU LA COQUELUCHE.

N^os	AGE	MALADIE	SEMAINE de la MALADIE	COMPLICATIONS	Hémolyse	REMARQUES
14	6 ans.	Scarlatine.	1	—	5	
59	11 à 12 a.	*Id.*	1	—	5	
44	10 à 12 a.	*Id.*	2	—	5	
18	6 ans	*Id.*	2	—	5	
15	9 ans.	*Id.*	3	—	5	
9	2 ans.	*Id.*	4	—	5	
16	3 ans.	*Id.*	4	D. B.	5	
19	4 ans.	*Id.*	4	—	5	
20	6 ans.	*Id.*	4	—	5	
46	2 ans 6 mois.	*Id.*	4	—	5	
21	6 ans.	*Id.*	4	—	5	

Nos	AGE	MALADIE	SEMAINE de la MALADIE	COMPLICATIONS	Hémolyse	REMARQUES
10	1 an 9 mois.	Scarlatine.	5	D. B.	4	
11	4 ans 6 mois.	*Id.*	5	—	5	
23	13 ans.	*Id.*	5	—	3	Renseignements du malade.
22	4 ans.	*Id.*	6	—	5	
28	9 ans.	*Id.*	6	—	4	Le frère du no 17.
24	6 ans.	*Id.*	6	—	3	
32	9 ans.	*Id.*	6	—	2	Renseignements du malade.
13	1 an.	*Id.*	7	—	5	
17	2 ans.	*Id.*	7	—	2	Examiné aussi dans la 8e semaine.
33	6 ans.	*Id.*	7	—	4	Examiné aussi dans la 7e semaine.
17	2 ans.	*Id.*	8	—	2	
12	4 ans.	*Id.*	8	Néphrite.	5	
29	3 ans.	*Id.* Récidive.	8 Récid.	—	4	
36	2 ans 6 mois.	Diphtérie.	1	—	1	Le frère de 9 frères et sœurs (le plus âgé 11 ans), dont quelques-uns ont été atteints de la coqueluche.
25	3 ans.	*Id.*	1	—	5	
39	10 ans.	*Id.*	1	—	3	
67	13 ans.	*Id.*	1	—	5	
26	12 ans.	*Id.*	2	—	5	
27	11 ans.	*Id.*	2	—	5	
8	4 ans.	*Id.*	2	Obs. pour la scarlatine.	5	
5	3 ans.	*Id.*	2	—	5	
30	2 ans.	*Id.*	2	—	5	Sang pris par une ponction du cœur, peu de temps après la mort.
4	4 ans.	*Id.*	2	—	5	
55	1 an.	*Id.* Croup.	2	Pneumonie apr. rougeole.	5	
60	5 ans.	Diphtérie, Croup.	2	Rougeole il y a 3 sem.	5	
62	6 ans.	Diphtérie, Croup.	2	—	5	
65	5 ans.	Diphtérie.	2	—	5	
37	3 ans.	*Id.*	3	—	5	

Nos	AGE	MALADIE	SEMAINE de la MALADIE	COMPLICATIONS	Hémolyse	REMARQUES
7	6 ans.	Diphtérie.	3	—	5	
3		*Id.*	3	—	5	
64	2 ans 6 mois.	*Id.*	3	—	5	
66	2 ans.	*Id.*	3	—	5	
68		*Id.*	3	—	5	
35	5 ans.	*Id.*	3	—	2	Un frère, plus âgé d'un an a eu la coqueluche.

Nos	AGE	MALADIE	JOUR de la MALADIE	COMPLICATIONS	Hémolyse	REMARQUES
63	1 a. 9 m.	Croup.	4	—	0	Un frère a eu la coqueluche il y a un an.
49	5 ans.	Diphtérie.	8	—	5	Sang pris par une ponction du cœur, peu de temps après la mort.
72	2 a. 9 m.	Rougeole.	5	Lues cong.	5	
73	1 a. 9 m.	*Id.*	6	—	5	
6	8 à 12 a.	*Id.*	6	—	4	
31	10 à 12 a.	*Id.*	7	Pneumonie.	5	*Id.*
41	2 ans.	*Id.*	9	—	5	
69	1 an.	*Id.*	9	Pneumonie.	5	
71	1 an 3 m.	*Id.*	11	Pneumonie.	5	
42	8 à 12 a.	*Id.*	12	Pneumonie.	5	*Id.*
45	2 ans.	*Id.*	13	—	5	
57	24 ans.	*Id.*	18	Laryngite.	5	
61	10 a. 1 m.	*Id.*	25	—	5	
58	11 à 12 a.	*Id.*	26	—	5	
54	6 mois.	*Id.*	32	Furoncles. + D B.	5	
53	10 à 12 a.	*Id.*	46	Rougeole *cordis* cong.	5 5	
1	18 ans.	Poliomyél.	6	—	5	
2	4 ans.	*Id.*	7	—	5	
50	1 an.	Laryngite, obs. pour le croup.	1	Pneumonie.	5	Sang pris par une ponction du cœur, peu de temps après la mort.
52	2 ans.	Obs. pour *Tussis* conv.	—	Pleurite.	5	Pas atteint de la coqueluche.
60	2 ans.	Obs. pour croup ou p. *Tussis* conv. Laryngite.	—	—	5	Pas atteint de la coqueluche.
65	6 mois.	Obs. pour *Tussis* conv. Diphtérie.	—	—	4	Pas atteint de la coqueluche.
56	4 a. 6 m.	Obs. pour scarlatine.	—	—	5	

Sur 123 sérums de malades qui étaient ou qui avaient été atteints de la coqueluche, 85, c'est-à-dire 69 p. 100, ont donné une réaction positive (empêchement de l'hémolyse); sur 70 sérums de malades extraits depuis la 3e semaine jusqu'au 6e mois du stade convulsif, 63, c'est-à-dire 90 p. 100, ont donné une réaction positive. Les 68 sérums de contrôle provenaient de 67 malades (le malade, examiné deux fois, a réagi positivement les deux fois); sur ces 67 malades, 8, soit 11,9 p. 100, ont réagi d'une manière positive.

Dans le tableau IV les résultats des réactions de fixation avec le sérum coquelucheux sont réunis et disposés aussi bien selon le degré de l'hémolyse que selon la période du stade convulsif. Les cas sur lesquels on n'a pas pu avoir des renseignements détaillés sont disposés de sorte que la coqueluche récemment guérie est rangée sous la rubrique du 3e mois du stade convulsif, et « plusieurs années » sous la rubrique de « plus de trois ans ».

TABLEAU IV.

Sérums de malades qui ont ou qui ont eu la coqueluche.

DEGRÉ de L'HÉMOLYSE	0	1	2	3	4	5	TOTAUX	MOYENNE des chiffres DE L'HÉMOLYSE
1 semaine	....	....	....	....	....	4	4	5
2 semaines	....	....	....	1	1	3	5	4,4
3 semaines	2	2	3	3	2	....	12	2
4 semaines	1	3	2	2	....	2	10	2,3
5 semaines	2	5	2	1	....	....	10	1,2
2 mois	2	6	2	1	....	....	11	1,1
3 mois	4	2	7	4	1	2	20	2,1
4 à 6 mois	1	1	2	3	....	....	7	2
6 mois à 1 an	....	1	1	....	1	1	4	3
1 à 2 ans	1	....	1	....	2	....	4	2,5
2 à 3 ans	1	....	1	1	2	9	8	3,5
Plus de 3 ans	3	1	6	4	5	3	28	3,2
Totaux	17	21	27	20	14	24	123	2,5

Les chiffres du tableau indiquent le nombre des sérums.

On appelle surtout l'attention sur le fait qu'on ne trouve pas de réactions fortement positives pendant la 1re et la 2e semaine, de même qu'on n'en trouve presque pas de négatives pendant les III-VIII semaines.

TABLEAU V.

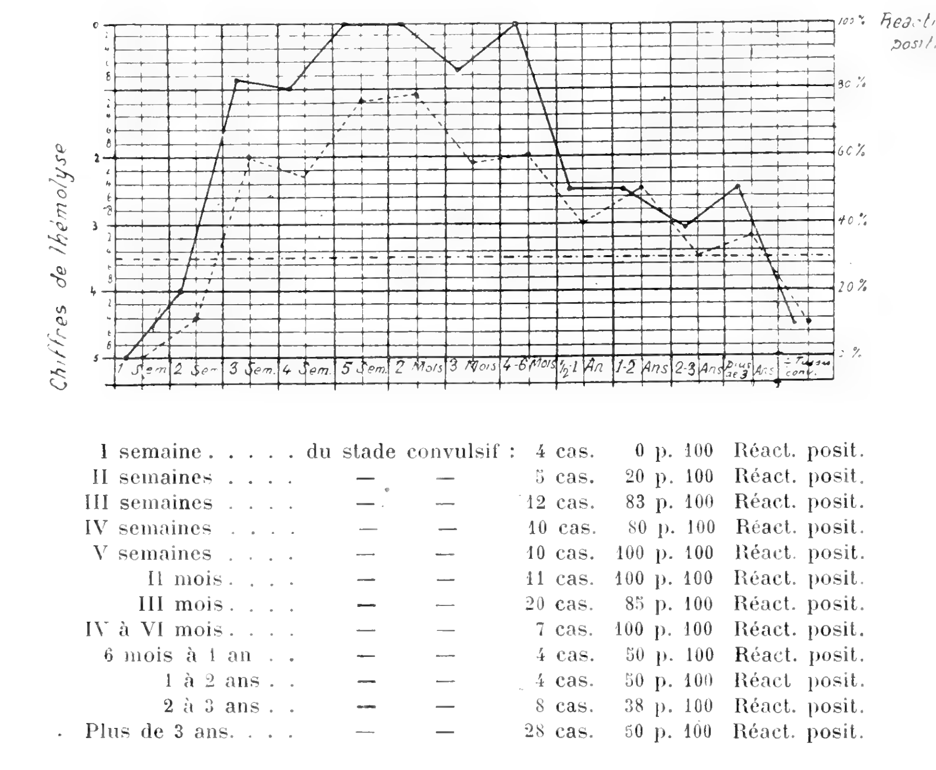
Sérums de malades qui n'ont pas eu la coqueluche.

MALADIES	0	1	2	3	4	5	TOTAUX	MOYENNE des chiffres DE L'HÉMOLYSE
Scarlatine	....	....	3	2	4	15	24	4,3
Diphtérie	1	1	1	1	....	19	23	4,3
Rougeole	....	....	....	....	1	13	14	4,9
Autres maladies .	....	....	....	....	....	7	7	5
Totaux. . . .	1	1	4	3	5	54	68	4,5

Il résulte de ce résumé que le sérum de malades qui sont ou qui ont été atteints de la coqueluche, donne très souvent une réaction de fixation du complément avec le bacille-Bordet comme antigène. La réaction ne se trouve pas pendant la 1re semaine, elle peut se rencontrer pendant la 2e semaine, et elle peut devenir manifeste quant au nombre et à l'intensité pendant la 3e semaine du stade convulsif; dans la série de recherches faites par moi elle atteint son maximum aussi bien en quantité qu'en qualité pendant le 2e mois, pour diminuer de nouveau peu à peu d'une manière assez continue; pourtant on peut rencontrer, même au bout de plusieurs années, une réaction positive.

Le pourcentage des réactions positives aux différents stades de l'affection est représenté ci-dessous à l'aide d'une courbe (la courbe noire) et d'un tableau. Cette courbe montre une augmentation depuis 0 au stade de l'incubation jusqu'à environ 100 p. 100 après le point culminant de l'affection, puis une diminution jusqu'à environ 50 p. 100 après la fin de la maladie. Pourtant cette courbe ne tient pas compte de la force de la réaction positive; pour montrer que les chiffres élevés au cours

de la maladie ne sont pas dus au fait que je n'ai pas ici laissé de côté les réactions douteuses, j'ai dessiné, fondée sur la moyenne des chiffres de l'hémolyse à l'intérieur de chaque groupe, une courbe dont l'abscisse indique la période de l'affection et l'ordonnée le degré de l'hémolyse. Une telle courbe représente ainsi en même temps l'intensité de l'hémolyse et le nombre des réactions (la courbe marquée par des points). On voit que cette courbe suit complètement la première.



I semaine.	du stade convulsif :	4 cas.	0 p. 100	Réact. posit.
II semaines	— —	5 cas.	20 p. 100	Réact. posit.
III semaines	— —	12 cas.	83 p. 100	Réact. posit.
IV semaines	— —	10 cas.	80 p. 100	Réact. posit.
V semaines	— —	10 cas.	100 p. 100	Réact. posit.
II mois. . . .	— —	11 cas.	100 p. 100	Réact. posit.
III mois. . . .	— —	20 cas.	85 p. 100	Réact. posit.
IV à VI mois. . . .	— —	7 cas.	100 p. 100	Réact. posit.
6 mois à 1 an . .	— —	4 cas.	50 p. 100	Réact. posit.
1 à 2 ans . .	— —	4 cas.	50 p. 100	Réact posit.
2 à 3 ans . .	— —	8 cas.	38 p. 100	Réact. posit.
Plus de 3 ans. . . .	— —	28 cas.	50 p. 100	Réact. posit.

On voit que la moyenne de l'hémolyse est 4,5 dans les cas de contrôle, ce qui peut être causé par le manque d'exactitude des renseignements. Non seulement des défauts de mémoire relativement à chaque enfant peuvent se produire quand il s'agit d'une foule d'enfants, mais la coqueluche peut se passer d'une manière abortive, de sorte que l'affection n'est pas du tout reconnue. Les trois enfants examinés au début de l'affection

(1re semaine du stade convulsif) et un enfant qui, d'après les renseignements, avait eu la coqueluche il y avait 6 mois, mais qui pendant le séjour à l'hôpital en fut atteint de nouveau (peut-être les renseignements ont été trompeurs; récidive?), ont montré tous l'hémolyse 5.

Si on regarde les différentes affections des cas de contrôle, on voit donc que les réactions positives se trouvent seulement parmi les cas de scarlatine et de diphtérie, où les malades sont souvent des enfants assez grands, et où par conséquent la possibilité d'avoir des renseignements inexacts est également assez grande, tandis qu'on n'a trouvé aucune réaction positive parmi les cas de rougeole où les malades, excepté un seul cas, n'avaient que 2 ans ou moins de 2 ans.

Dans la plupart des cas de coqueluche on ne peut donc s'attendre à une réaction de fixation positive avec le bacille-Bordet comme antigène qu'à la 3e semaine du stade convulsif, quelquefois seulement à la 4e ou à la 5e semaine, comme dans les cas n° 69 et n° 133 (tableau II). La réaction peut rester positive pendant plusieurs années, pourtant elle peut aussi disparaître assez vite comme dans le cas n° 131 (tableau II), qui avait donné dans la 3e semaine une réaction positive et dans le 3e mois une réaction négative. Ce résultat correspond essentiellement à celui de Weil et Netter, ces auteurs ayant trouvé chez 16 enfants une réaction négative dans la 1re semaine et une réaction positive constante à partir de la 3e semaine (16 enfants), ainsi qu'à celui de Friedländer et Wagner qui, chez 18 enfants atteints d'une coqueluche manifeste, ont trouvé dans tous les cas une réaction positive, tandis que, sur 3 enfants atteints d'une coqueluche au début, deux ont réagi d'une manière positive, le 3e d'une manière négative (on a employé un sérum actif).

Dans 6 cas j'ai eu l'occasion de suivre l'intensité de la réaction au cours de la maladie, depuis une réaction nulle ou faible jusqu'à une réaction décidément positive. Le petit nombre de cas est dû à ce fait que le matériel est assez difficile à procurer; le plus souvent il s'agit de malades à une période si peu avancée de la maladie qu'ils ne sont pas

encore l'objet d'une observation ou d'un traitement. Ces cas, qui se trouvent aussi dans le tableau II, sont réunis dans le tableau VI.

TABLEAU VI.

Nos	DATE de L'EXAMEN	PÉRIODE du STADE CONVULSIF	HÉMOLYSE	OBSERVATION
	1913			
102	1er décembre.	2 semaines.	5	
	6 décembre.	2 semaines.	5	
	13 décembre.	3 semaines.	0	
101	1er décembre.	2 semaines.	5	
	6 décembre.	3 semaines.	1	
	13 décembre.	4 semaines.	0	
	1914			
69	15 janvier . .	2 à 3 semaines.	4	
	30 janvier . .	4 semaines.	2	
	4 février . .	5 semaines.	2	
133	4 février . .	ca. 2 semaines.	4	
	14 février . .	3 à 4 semaines.	4	
	24 février . .	5 à 6 semaines.	0	
89	3 mars . . .	ca. 1 semaine..	5	
	14 mars . . .	3 semaines.	3	
	20 mars . . .	4 semaines.	2	
93	4 mars . . .	2 semaines.	3	
	14 mars . . .	4 semaines.	3	
	20 mars . . .	5 semaines.	0	Également avec la demi-dose du sérum (0,1-2,5) un empêchement fort (hémolyse 1).

Je n'ai pas eu l'occasion d'examiner plus tard un malade qui dans la 1re semaine du stade convulsif avait donné une réaction négative (n° 38, tableau II); quant à un autre malade (n° 97, tableau II), l'examen dans la 3e semaine a été négatif et aucune occasion d'examen ne s'est présentée plus tard.

Dans tous les cas de coqueluche qui ont été observés à une période de la maladie où on a pu mettre en évidence les

anticorps correspondant au bacille-Bordet *ces anticorps se sont formés et ont augmenté au cours de la maladie*; cette circonstance est assez importante quand il s'agit de juger du rôle étiologique du bacille-Bordet dans la coqueluche.

Les résultats des réactions de la fixation du complément de Bordet-Gengou dans la coqueluche avec le bacille-Bordet comme antigène, correspondent donc assez exactement aux résultats des autres réactions de l'immunité comme par exemple : l'agglutination dans la fièvre typhoïde. Dans la littérature qui est à ma disposition, je n'ai pu trouver une série suivie de recherches correspondant à celle faite par moi dans la coqueluche, par conséquent je n'ai pu faire une comparaison avec la marche des réactions de fixation faites dans d'autres maladies d'après la méthode de Bordet-Gengou.

Sur 70 épreuves sur des sangs extraits pendant ou après la coqueluche, où on pourrait s'attendre à une réaction positive (3e semaine — 6e mois), il y en avait 7 qui ont réagi d'une manière négative; ces 7 sérums provenaient de 7 malades dont 2 se trouvaient dans la 3e semaine, 2 autres dans la 4e semaine, et 3 dans le 3e mois du stade convulsif. Les 2 malades qui étaient dans la 3e semaine, n° 69 et n° 133, ont donné une réaction positive respectivement dans la 4e et dans la 5e semaine (voyez le tableau VI); dans ces cas il a donc été question d'une réaction positive paraissant relativement tard. Les deux malades étant dans la 4e semaine étaient les n°s 92 et 59 (tableau II). Le n° 92 était atteint de la coqueluche compliquée de la pneumonie, et il a donné dans la 3e semaine, dans laquelle la pneumonie s'est manifestée, l'hémolyse 2. Dans la 4e semaine, quand le malade est mort après avoir eu pendant quelques jours des accès cérébraux légers, le sang pris par une ponction du cœur, peu de temps après la mort, a montré l'hémolyse 5. Le n° 59 est entré à l'hôpital dans la 4e semaine et il est mort le jour même de son entrée après des accès d'éclampsie assez graves. Le sang pris peu de temps après la mort a montré, dans ce cas aussi, l'hémolyse 5. A l'autopsie on a trouvé une pneumonie et une hyperémie grave du cerveau.

Les trois malades qui ont réagi négativement dans le 3e mois

étaient le n° 131, ayant donné une réaction positive dans la semaine, et les n°s 98 et 85 qui tous deux étaient atteints de la rougeole ; le n° 98, examiné 12 jours après l'apparition de l'exanthème, avait de légères quintes de toux coquelucheuse, mais il se portait d'ailleurs bien et il a eu la maladie sans complications. Le n° 85 était atteint et de la pneumomie et de la rougeole ; il est mort de la pneumonie 6 jours après l'apparition de l'exanthème. Le sang du cœur, pris peu de temps après la mort, a donné l'hémolyse 5.

Le fait qu'il peut se trouver dans une série de recherches de cette sorte quelques cas où on ne peut mettre en évidence les anticorps spécifiques n'empêche pas que l'infection dont il s'agit ait eu lieu; c'est un phénomène bien connu dans d'autres réactions d'immunité que la production des anticorps spécifiques dans le sérum est soumise à des oscillations individuelles et qu'il se rencontre des cas où la présence de ces anticorps ne peut se constater malgré l'infection éprouvée. Quant au n° 92 cette explication n'est pas suffisante, le malade ayant réagi déjà d'une manière positive. Il se pourrait donc que dans ce cas il fallût chercher la cause de la réaction dans une production augmentée de toxines, causée par la pneumonie, ces toxines neutralisant les anticorps circulants, ou peut-être dans une irruption des microbes spécifiques dans les veines, ce qui aurait donné le même résultat. Sans doute on peut trouver dans la coqueluche une infection bactérienne causée par le bacille-Bordet; Seiffert a réussi ainsi à isoler le bacille-Bordet du sang, du foie, des bronches et des poumons d'un enfant mort de la broncho-pneumonie consécutive à la coqueluche; Klimenko a réussi également à isoler le bacille-Bordet de l'oreillette droite et des parties catarrhales des poumons d'un enfant mort dans la 3e semaine du stade convulsif. Par contre l'examen bactériologique du sang de 33 malades pris *in vivo* a donné un résultat négatif. Dans les 7 cas de coqueluche au stade convulsif où j'ai extrait le sang par une ponction du cœur peu de temps après la mort, ce sang a été toujours stérile. Il faut aussi, ce qui a été accentué par Klimenko qui s'appuie sur un grand matériel expérimental (57 chiens), supposer la possibilité que les bacilles se multiplient après la mort et que des poumons ils pénètrent dans les veines.

Quant aux cas qui ont donné une réaction négative dans le 3e mois, on peut supposer une disparition prématurée de la réaction, conformément à ce qu'on a trouvé chez le n° 87.

Quant aux deux cas compliqués de rougeole, la réaction négative pourrait être due non seulement à la possibilité d'une disparition prématurée de la réaction, mais aussi à la période « anergique » dont l'apparition dans la rougeole a été constatée par v. Pirquet; d'après les recherches de cet auteur la période en question se manifeste dans la tuberculose par l'absence d'une réaction cutanée ou sous-cutanée de la tuberculine chez les malades qui autrement réagissent d'une manière positive; cette absence de la réaction se voit pendant une période qui va depuis environ un jour avant l'apparition de l'exanthème jusqu'à environ 6 jours après cette apparition; après cette période la réaction apparaît de nouveau augmentant continuellement à moins qu'il ne survienne une tuberculose miliaire ou des maladies semblables.

Pendant cette période « anergique », où les antitoxines sont paralysées d'une manière quelconque, le malade est particulièrement sensible à l'infection en question.

Quant à la coqueluche on voit souvent que les accès déjà diminués augmentent de nouveau au cours de la rougeole, ce qui, selon ce qui précède, pourrait s'attribuer à la paralysie des anticorps; cette paralysie se manifesterait, conformément à ce qui a lieu dans la tuberculose, par l'absence des réactions d'immunité.

Dans la littérature à ce sujet cette possibilité n'a été mentionnée que par Weil; sur 3 enfants, respectivement dans la 3e et la 5e semaine et dans le 3e mois du stade convulsif, deux étaient au premier jour de l'exanthème de rougeole, le 3e au 3e jour de celui-ci. Le résultat d'une réaction de fixation du complément avec le bacille-Bordet comme antigène a été complétement négatif chez les 2 enfants au premier jour du stade exanthématheux et faiblement positif chez le 3e.

Pour mieux vérifier ce résultat j'ai examiné le sang de quelques enfants ayant eu la coqueluche, aux différentes périodes après l'apparition de l'exanthème de la rougeole. Les résultats sont cités dans le tableau VII.

TABLEAU VII

(*Les numéros : tableau II*)

Nos	JOUR de L'EXANTHÈME de la ROUGEOLE	PÉRIODE de la COQUELUCHE	COMPLICATIONS	Hémolyse	REMARQUES
73	1	Plusieurs années.	—	0	
55	1	Guérie.	—	0	
106	1	3 mois.	Pneumonie.	2	
119	2	5 mois.	—	3	
113	3	6 mois à 1 an.	—	1	
110	4	5 ans.	—	4	
52	5	1 an.	—	0	
85	6	3 mois.	Pneumonie.	5	
114	6	6 mois à 1 an.	—	4	
106	6	3 mois.	—	3	Examiné aussi le premier jour de l'exanthème.
111	6	2 à 3 ans.	—	3	
51	8	3 mois.	—	0	
117	8	4 mois.	—	3	
112	9	3 mois.	—	2	
116	11	4 mois.	—	2	
98	12	3 mois.	Pneumonie.	5	
61	Guérie.	Guérie.	Pneumonie.	3	Marques d'après l'exanthème de la rougeole.
91	18	3 semaines.	—	0	
130	20	2 mois.	Pneumonie.	0	
108	21	6 mois à 1 an.	—	5	
109	30	4 ans.	—	4	

Comme on le voit par ce résumé, j'ai eu un résultat tout à fait contraire à celui trouvé par Weil, l'infection de la rougeole n'ayant eu dans mes expériences aucune influence sensible sur le résultat de la réaction, surtout pendant les premiers jours de l'exanthème.

III

ESSAIS DE CONTROLE

Les résultats des réactions de fixation avec le sérum de malades n'ayant pas eu la coqueluche, et avec le bacille-Bordet comme antigène, sont cités dans le tableau III.

Sur 67 malades, 8, dont 4 étaient atteints de la scarlatine et 4 de la diphtérie, ont réagi positivement. Parmi les 4 atteints de la scarlatine, les renseignements sur 2 d'entre eux, à savoir le n° 23, âgé de 13 ans et le n° 32, âgé de 9 ans, sont dus aux malades eux-mêmes. Le n° 24, âgé de 6 ans, était l'enfant unique des parents et ceux-ci ont déclaré nettement que l'enfant n'avait pas eu la coqueluche. Le n° 17 était âgé de 2 ans et il a donné aussi à plusieurs reprises une réaction positive. D'après les renseignements l'enfant n'avait pas eu la coqueluche et un frère âgé de 9 ans qui était, lui aussi, atteint de la scarlatine réagit négativement (l'hémolyse 4).

Des 4 malades atteints de la diphtérie, le n° 36 avait 9 frères et sœurs dont le plus âgé avait 11 ans; quelques-uns de ceux-ci avaient eu la coqueluche. Quant aux n°s 63 et 35, les frères et les sœurs avaient eu également la coqueluche sans être isolés, pendant la maladie, des malades examinés. Le n° 39 était l'enfant unique des parents et d'après les renseignements il n'avait pas eu la coqueluche.

Il faut donc supposer que 3 de ces 8 malades qui ont réagi positivement avaient eu la coqueluche; quant à 2 des malades les renseignements sont dus aux enfants mêmes, dans 3 cas seulement il n'y a pas de raison plausible de douter de l'authenticité des renseignements fournis, ce qui pourtant n'empêche pas que les enfants aient pu avoir la coqueluche, mais que celle-ci, à cause d'une apparition abortive ou atypique, n'a pas été reconnue.

Il se rencontre quelquefois dans l'expectoration des rougeoleux des microbes qui, par l'examen microscopique et la coloration, ne se distinguent pas du bacille-Bordet, et, par leur

isolement par leur culture n'a que peu de chance de réussir — selon l'expérience faite dans la rougeole — à cause de l'abondance extrêmement grande d'autres microbes différents, aussi dans mes essais de contrôle j'ai fait attention aux malades ayant eu antérieurement la rougeole.

Outre les 14 cas de rougeole examinés depuis 5 jours après l'apparition de l'exanthème jusqu'à 46 jours après cette apparition, il se trouvait dans le tableau III, parmi les malades atteints de la scarlatine, 8 ayant eu antérieurement la rougeole dont 2 (n° 23 et n° 24) ont réagi positivement; parmi les malades atteints de la diphtérie, 12 dont 1 (n° 63) a réagi d'une manière positive; parmi ces 12 malades atteints de la dipthérie et ayant eu la rougeole, 2 en avaient été atteints il y avait 3 semaines, 2 il y avait 3 mois; tous les 4 ont réagi négativement. Des autres cas de contrôle deux avaient eu la rougeole, l'un il y avait 6 semaines; tous les deux ont réagi négativement. En somme il y avait donc 36 malades ayant eu la rougeole, depuis 5 jours après l'apparition de l'exanthème jusqu'à plusieurs années après la guérison de cette maladie. Trois parmi eux ont réagi positivement; l'un de ceux-ci (n° 63) avait eu probablement la coqueluche.

Ce résultat est décidément contraire à la supposition que les microbes observés au microscope dans la rougeole, et qui ressemblent au bacille-Bordet, soient identiques à celui-ci.

Quelques-uns des bacilles isolés de l'expectoration coquelucheuse et semblables au bacille de l'influenza, mais non pas identiques au bacille de Bordet, ont été essayés comme antigène dans des tentatives de fixation du complément avec le sérum des malades de la coqueluche. Ces tentatives ont été pratiquées en même temps que des tentatives de fixation avec le bacille-Bordet comme antigène, lorsqu'il y avait assez de sérum; sinon, quelques jours plus tard. Dans le tableau des résultats de ces tentatives est indiqué en même temps le résultat de la tentative de fixation avec le bacille-Bordet. Dans 4 cas il n'y a pas de tentative avec le bacille-Bordet puisque je n'avais pas encore à ma disposition une souche de ce bacille. Les numéros d'ordre de ce tableau (tabl. VIII) correspondent complètement aux numéros du tableau II.

Tableau VIII

Nos	PÉRIODE de la COQUELUCHE	SOUCHE de L'INFLUENZA	HÉMOLYSE	HÉMOLYSE avec le BACILLE-BORDET
102	2 semaines.	102	5	5
102	3 semaines.	102	4 à 5	0
101	3 semaines.	102	5	1
107	3 semaines.	91	5	3
59	4 semaines.	91	5	5
89	4 semaines.	85	5	2
103	4 semaines.	91	5	1
80	4 semaines.	84	5	1
120	4 semaines.	91	5	3
93	5 semaines.	85	5	0
127	5 semaines.	91	5	1
127	5 semaines.	74	5	
15	5 semaines.	91	5	3
15	5 semaines.	74	5	
123	5 semaines.	91	4	1
7	5 semaines.	91	4 à 5	2
	5 semaines.	74	5	
121	5 semaines.	85	5	1
11	2 mois.	15	5	
34	2 mois.	15	5	
106	2 mois.	91	5	2
106	2 mois.	101	4 à 5	1
51	3 mois.	101	5	0
114	2 mois.	101	5	0
105	2 mois.	91	4 à 5	1
105	3 mois.	101	5	1
Sv. J.	3 mois.	15	5	
86	3 mois.	85	5	0
49	5 mois.	85	5	0
H. P.	5 mois.	15	5	
6	2 mois.	91	5	1
100	Guérie.	91	5	3
100		74	5	
132	3 semaines.	84	5	2

Il résulte de ce qui précède *que les bacilles isolés de l'expectoration coquelucheuse, qui ressemblent au bacille de l'Influenza et qui ne sont pas identiques au bacille-Bordet, ne produisent pas d'anticorps manifestes amenant la fixation du complément dans le sérum de malades de la coqueluche.*

Recherches sur l'agglutination.

J'ai examiné la plupart des souches isolées du bacille-Bordet et du bacille de l'influenza quant à l'agglutination sous l'influence des sérums de 50 malades atteints de la coqueluche et de 13 cas de contrôle. Cette série de recherches a montré : 1° *que l'agglutination du bacille-Bordet n'est pas un phénomène constant dans la coqueluche*; 2° *que l'agglutination a lieu aussi souvent dans les cas compliqués que dans les cas non compliqués*; 3° *que le sérum agglutine les échantillons du bacille de l'Influenza, isolées de l'expectoration coquelucheuse, dans un grand nombre de cas de coqueluche compliqués d'affections des poumons, rarement dans les cas non compliqués*; 4° *que l'agglutination des bacilles de l'Influenza cultivés de l'expectoration coquelucheuse sous l'influence du sérum coquelucheux est à peine un phénomène spécifique.*

* * *

Mes recherches confirment donc essentiellement les indications de Bordet, les recherches sérologiques surtout ayant démontré que, dans le sérum de malades atteints de la coqueluche, il se rencontre constamment à certaines périodes de l'affection des anticorps spécifiques correspondant au bacille-Bordet dont l'existence se constate par la réaction de la fixation du complément de Bordet, et que la manière d'agir de ces anticorps correspond essentiellement aux expériences faites dans d'autres maladies dont le virus était connu.

D'après mon opinion, ceci prouve avec assez de certitude que le bacille-Bordet doit être regardé comme l'agent pathogène de la coqueluche.

LITTÉRATURE

AFANASSIEF. — Ætiologie und klinische Bakteriologie des Keuchhustens. *St. Petersburger med. Wochenschr.*, 1887 (Ref. d'après Klimenko et Poleff).

ALMQUIST. — Einfluss von Jahreszeit und Witterung auf das Auftreten von Infektionskrankheiten. *Zeitschr. f. Hygiene*, Bd 5, 1889.

ARNHEIM (G.). — Beitrag zur Ætiologie des Keuchhustens. *Berliner klin. Wochenschr.*, 1900.

— Zur Pathogenese des Keuchhustens. *Berliner klin. Wochenschr.*, 1903.

— Ueber den gegenwärtigen Stand der Keuchhustenfrage. *Berliner klin. Wochenschr.*, 1908.

— Keuchhustenuntersuchungen. *Arch. für Kinderheilkunde*, Bd 50, 1909.

— Bemerkungen zu Klimenko. *Centralbl. f. Bakteriologie*, Bd 58, 1911.

BÆCHER et MENSCHIKOFF. — Ueber die ätiologische Bedeutung des Bordet'schen Keuchhustenbacillus und der Versuch einer specifischen Therapie der Pertussis. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 61, 1911.

BOAS. — *Wassermanns Reaktion*, 1910.

BORDET et GENGOU. — Le microbe de la coqueluche. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XX, 1906.

— Note complémentaire sur le microbe de la coqueluche. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXI, 1907.

— Étiologie de la coqueluche. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 43, 1907.

— Étiologie de la coqueluche. *Bull. de l'Acad. royale de méd. de Belgique* t. XXII, 1908 (Ref. La semaine méd. 1908).

— Étiologie de la coqueluche. État actuel de question. *Centralbl. f. Bakt.*, Ref. Bd 43, 1909.

— L'endotoxine coquelucheuse. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIII, 1909.

— Le diagnostic de la coqueluche fruste par la méthode de la fixation d'alexine. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 58, 1911.

BORDET et SLEESWYK. — Sérodiagnostic et variabilité des microbes suivant le milieu de culture. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIV, 1910.

BORDET. — Note complémentaire sur le microbe de la coqueluche et sa variabilité au point de vue du sérodiagnostic et de la toxicité. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 66, 1912.

BUTTERMILCH. — Ueber den Erreger des Keuchhustens. *Berliner klin. Wochensc.*, 1899.

BURGER. — Der Keuchhustenpilz. *Berliner klin. Wochenschr.*, 1883 (Ref. Klimenko, Sticker).

CZAPLEWSKI et HENSEL. — Bakteriologische Untersuchungen bei Keuchhusten. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1897 ou 1898.

— Bakt. Untersuchungen bei Keuchhusten. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 22 et 24, 1897.

CZERNY. — Zur Therapie des Keuchhustens. *Therap. Monatshefte*, 1908.
DOBELI. — Zur Ætiologie und Pathologie des Keuchhustens. *Correspondenzbl. f. Schweizerärzte*, Jg. 42, 1912.

DUTHOIT. — Communication préliminaire sur le traitement sérothérapeutique de la coqueluche. *Bull. de l'Académie royale de méd. de Belgique*, t. XXVII, 1913 (Ref. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 61, 1914).

ELMASSIAN. — Note sur un Bacille des voies respiratoires. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899.

FEER. — Behandlung des Keuchhustens. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1908.
— Ueber das Wesen und über die Infektionsverhältnisse des Keuchhustens. *Med. klin.*, Jg. 10, N° 20.
FINIZIO (G.). — Der Bordet-Gengou'sche Bacillus in der Ætiologie des Keuchhustens. *Zeitschr. f. Kinderheilk.*, Bd 3, 1911.
FRÆNKEL (C.). — Untersuchungen zur Entstehung des Keuchhustens. *Münchener med. Wochenschr.*, 1908.
FREEMANN. — Meddelelse fra « 77 Jahresvers der « Brit. med. Ass. » 1909 » (Originalbericht *Centralbl. f. Bakt.*, Ref. Bd 45, 1910).
FRIEDLÆNDER et WAGNER. — Diagnostic of whooping-cough by the complement-deviation test. *Journ. amer. med. ass.*, vol. 62, 1914.

INABA. — Ueber den Bordet-Gengou'schen Keuchhustenbacillus, besonders Uebertragungsversuche des Keuchhustens auf Tiere. *Zeitschr. f. Kinderheilk.*, Bd IV, 1912.

JACOBSEN (I.) et A. MEYER. — Undersøgelser over Kighostebacillen (Bordet-Gengou's *Bacil*). *Hospitalstidende*, n° 25, 1915.
JOCHMANN. — Zur Ætiologie des Keuchhustens. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 30, 1902.
JOCHMANN et KRAUSE. — Zur Ætiologie des Keuchhustens. *Zeitschr. f. Hygiene*, Bd 36, 1901.
JOCHMANN et MOLTBRECHT. — Bac. pertussis Eppendorf. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 34, 1903.

KLIMENKO. — Zur Frage über den Keuchhustenerreger von Bordet und Gengou. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 40, 1907.
— Zur Ætiologie des Keuchhustens. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1908.
— Ueber das Keuchhustenstäbchen von Bordet und Gengou. *Centralbl. f. Bakt.* Bd 46, 1908.
— Die Ætiologie des Keuchhustens. Experimenteller Keuchhusten. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 48, 1909.
— Morphologie und Biologie des Keuchhustenbacillus. *Centralbl., f. Bakt.*, Bd 50, 1909.
— Bakteriologische Untersuchungen des Blutes von keuchhustenkranken Kindern und von mit Keuchhusten infizierten Tieren. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 56, 1910.
— Sur le sérum anticoquelucheux et son emploi. *Arch. des sciences biol.*, pub. par l'Inst. impérial de méd. expériment., t. XVII, 1912.
KOLLE et WASSERMANN. — *Handbuch der pathog. Mikroorganismen.* 1re édition, 1903-1907.

Koplik. — Die Bakteriologie des Keuchhustens. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 22, 1897.
Kraus et Levaditi. — *Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung*. 1907-1901.

Leuriaux. — L'agent pathogène de la coqueluche et la sérothérapie de cette affection. *La semaine médicale*, 1902.
Lehmann et Neumann. — *Bakteriologie*. 5 Aufl., 1912.
Luzzato. — Zur Ætiologie des Keuchh. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 27, 1900.

Macewen. — The conveyance of whooping cough from man to animals by direct experiment. *Brit. medic. Journal*, 1908.
Mallory, Horner et Henderson. — The relation of Bordet-Gengou Bacillus to the lesion of pertussis. *Journ. of medical research*, vol. 27, 1913 (Ref. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 59, 1914).
Manicatide. — Ueber die Ætiologie und Serotherapie des Keuchhustens. *Zeitschr. f. Hygiene*, Bd 45.
— Der Komplementbindungsvorgang bei Keuchhusten. *Zeitschrift f. Kinderheilk.*, Bd 7, 1913.
Menschikoff. — Der Erreger des Keuchhustens. *Russky Vratch*, 1909 (Ref. *Münchener med. Wochenschr.*, 1910).
Müller (P. Th.). — *Vorlesungen über Infektion und Immunität*, 4. Aufl., 1912.
— *Vorlesungen über allgemeine Epidemiologie*, 1914.

Neurath. — Keuchhusten (*Pfaundler et Schlossmann : Handb. der Kinderheilk.*).

Odaire. — Beiträge zur Kenntnis der hämoglobinophilen Bacillen, mit besonderer Berücksichtigung des Bordet'schen Bacillus. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 61, 1911.

Perret et Givre. — Note clinique sur 300 cas de coqueluche. *Province médicale*, 1882 (cit. d'après Weill et Pehu).
Pirquet-Jurgensen. — *Morbilli Monografi*, 1911.
Poleff. — Ueber den Bordet-Gengou'schen Keuchhustenbacillus. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 69. 1913.
Popper. — Ueber Pertussis. *Med. Klin. Jg.*, 10, 1914.

Reyher. — Zur Ætiologie des Keuchhustens. *Jahrbuch f. Kinderheilk.*, Bd LVIII, 1903.
— Ein weiterer Beitrag zur Pathologie des Keuchhustens. *Charité Ann.*, 1904.
— Bakt. Untersuchungen bei Keuchhusten. *Verh. d. Gesellsch. f. Kinderheilk*, Meran, 1905. Originalbericht. *Centralbl. f. Bakt.*, 1906.
— Ueber die Bedeutung der bakt. Befunde bei den im Verlaufe des Keuchhustens auftretenden Bronchopneumonien. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 14, 1907.
Ritter (Jul.). — Ueber den Keuchhusten. *Berliner klin. Wochensch.*, 1896.
— Das Problem des Wesens und der Behandlung des Keuchhustens. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1914 (Ref. *Centr. f. Bakt.*, Bd, 61, 1914).

Salomonsen (C. J.). — *Bakteriologisk Teknik*. 1894.
Savini. — Manicatides Bacillus. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd, 50, 1909.
Schiga, Imai, Eguchi. — Eine Modification von Bordet-Gengou's Nährboden

für die Keuchhustenbacillen, nebst einigen Ergebnissen in serologischer Beziehung. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 69, 1913.

SEIFFERT. — Ueber den Bordet'schen Keuchhustenbacillus. *Münchener med. Wochenschr.*, 1909.

SOULIMA (H. et A.). — Contribution à l'étude de l'étiologie de la coqueluche. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXIII, 1907.

SPENGLER. — Bakteriologische Untersuchungen bei Keuchhusten. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1897.

— Zur Ætiologie des Keuchhustens. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd 29 1901.

STICKER. — *Der Keuchhusten Monografi*, 1911.

STICKER-LEICHTENSTERN. — *Influenza Monografi*, 1912.

TEDESCO. — Bericht über die Influenzauntersuchungen an der Prosektur des Kaiser Franz Joseph-Spital. *Centralblat. f. Bakt.*, Bd 43, 1907.

VINZENZI. — Zur Ætiologie des Keuchhustens. *Centr. Bakt.*, Bd 31, 1910.

WEIL. — La déviation du complément vis-à-vis du bacille de Bordet-Gengou dans la coqueluche. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXIV, 1913.

WEIL et NETTER. — La déviation du complément par le bacille de Bordet-Gengou dans la coqueluche. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXIV, 1913.

WEILL. — *Congrès de médic. interne de Lyon*, 1894 (cit. d'après Weill et Pehu).

WEILL et PEHU. — Prophylaxie et traitement de la coqueluche. *La Semaine médicale*, 1901.

WELDE. — Beitrag zur Ætiologie des Keuchhustens. *Monatschr. f. Kinderheilk.*, Bd 10, 1911.

WOHLWILL. — Ueber Influenzabacillen in Bronchialbaum. *Münchener med. Wochenschrift*, 1908.

WOLLSTEIN. — The Bordet-Gengou *Bacillus of Pertussis. Journ. of experiment. med.*, vol. 7, 1905.

— The Bordet-Gengou *Bacillus of Pertussis. Journ. of experiment. med.*, vol. 11, 1909.

ZUSCH. — Bakteriologische Untersuchungen bei Keuchhusten, *Münchener med. Wochenschr.*, 1898.

— *Id. Centralbl. f. Bakt.*, 1898.

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

32e ANNÉE DÉCEMBRE 1918 N° 12.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET PROPHYLACTIQUES DU PALUDISME

QUINZIÈME ET SEIZIÈME CAMPAGNES EN ALGÉRIE EN 1916 ET 1917 (1)

par Edmond SERGENT et Étienne SERGENT.

(Institut Pasteur d'Algérie.)

ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Deux grands faits dominent l'histoire du paludisme en Algérie durant les deux années 1916 et 1917 : épidémie de paludisme foudroyant dans le département d'Alger en 1916, épidémie de paludisme foudroyant dans le département d'Oran en 1917. Ces épidémies, par leur gravité, ont eu un retentissement sur la vie économique des régions atteintes; survenant au moment des travaux agricoles, elles ont gêné les colons qui, quelquefois, ont manqué de main-d'œuvre; la gravité a été telle en certains endroits de la Mitidja en 1916, que la population craignait d'être atteinte par une maladie épidémique contagieuse nouvelle.

La mortalité des indigènes augmenta beaucoup en 1916, dans

(1) Campagne dirigée pour le compte du Gouvernement général de l'Algérie. Pour les campagnes précédentes, voir : *Annales de l'Institut Pasteur* et *Atti della Società per gli Studi della Malaria*, Roma.

le département d'Alger, en 1917 en Oranie. Les cas mortels chez les Européens furent également nombreux.

I. — GITES A ANOPHÉLINES

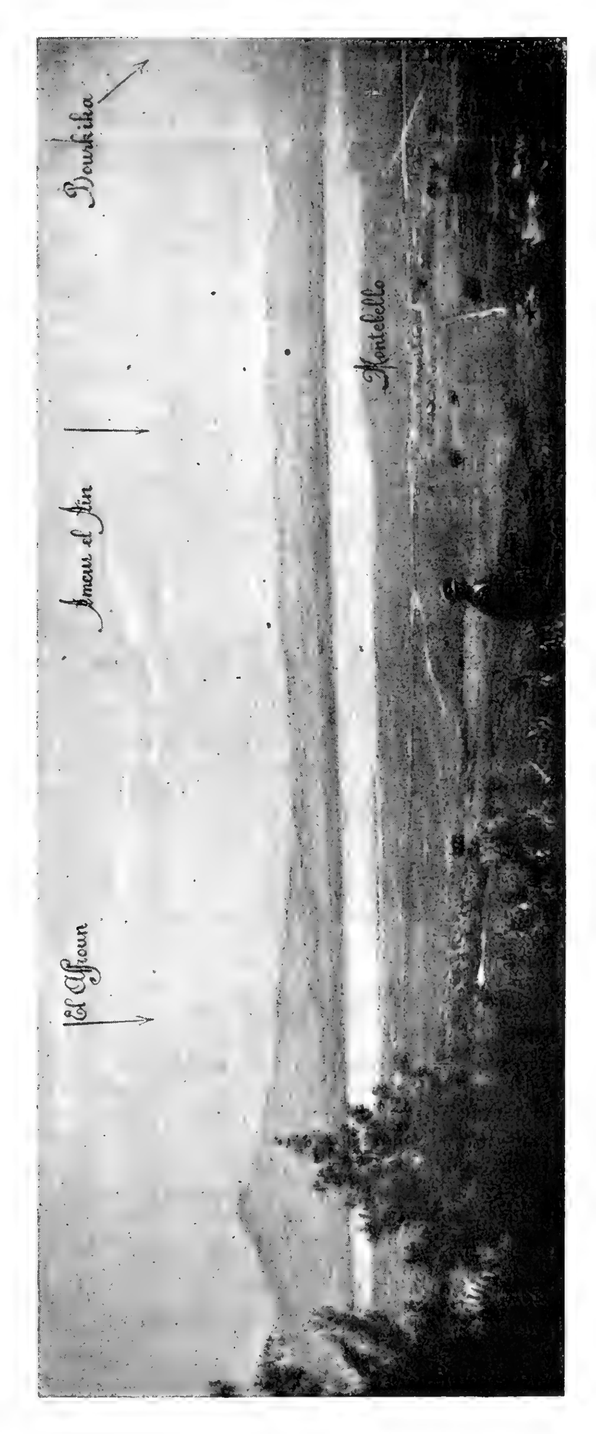
Pluies de printemps. — Aux deux grands faits signalés plus haut (épidémies violentes en 1916, dans le département d'Alger, et en 1917, en Oranie), correspondent très nettement des circonstances météorologiques exceptionnelles. Au début de juin 1916, des pluies extraordinairement abondantes provoquèrent des inondations très étendues dans le département d'Alger, particulièrement dans la Mitidja. La cuvette du lac Halloula, qui reçoit les eaux de pluies de presque toute la Mitidja occidentale, a été complètement submergée; une surface d'eau de plus de 700 hectares a couvert cette partie de la plaine au mois de juin (voir la figure ci-contre), c'est-à-dire au moment de la plus grande pullulation des larves d'Anophèles. Les chaleurs de l'été survenant brusquement après ces énormes précipitations pluviales, les Anophèles mirent à profit les immenses gîtes formés et des myriades de moustiques purent s'y développer.

C'est dans une zone exactement calquée sur celle où ces pluies exceptionnelles se sont produites, qu'un paludisme tout à fait anormal s'est abattu sur la population, même dans des régions saines d'habitude.

De même en Oranie, des pluies extraordinaires ont eu lieu, les premiers jours de juin 1917, ce qui est exceptionnel dans cette région. L'été qui suivit, une éclosion formidable d'Anophèles se produisit, et une violente épidémie de fièvres désola le département d'Oran.

Conditions défavorables créées par la guerre. — Par la raréfaction de la main-d'œuvre, par la mobilisation des chefs de chantiers, bien des travaux d'entretien des canaux, des fossés, des drains ont été négligés. A la fin de l'été 1917, les travaux antilarvaires ont dû être suspendus à Montebello, le chef du chantier étant parti aux Armées.

Vols considérables d'Anophèles en automne : influence du vent et des orages. — On a pu assister, en octobre 1917, à des invasions extraordinaires de moustiques dans les localités avoisinant les marais de la Macta (département d'Oran) : Fermeblanche, Debrousseville, La Macta, Port-aux-Poules, comme



Inondation de la cuvette du lac Halloula (d'ordinaire sèche en été).

700 hectares submergés au début de l'été 1916.

on assistait il y a quelques années à des invasions formidables, à Mondovi (département de Constantine), au même moment de l'année (octobre).

Ces invasions subites coïncident, généralement, avec des orages mêlés de vent, et les habitants ne manquent jamais d'affirmer que c'est le vent qui a transporté ces grands vols d'insectes. Pourtant, lorsque le vent souffle, les Anophèles sont cachés dans les habitations de façon à ne pas être broyés. Il semble que ce n'est pas le vent, dans ce cas, qu'il faille incriminer, mais la température orageuse qui excite les moustiques à piquer et à voler loin de leur lieu d'éclosion, dans l'intervalle des coups de vent.

Flore des gîtes à Anophélines (dans le Tell). — Les « mousses » vertes, gluantes, qui poussent rapidement en été dans les lits graveleux des oueds (gîtes à *Pyretophorus*) ou sur le bord des fontaines, des abreuvoirs abandonnés (gîtes à *Anopheles maculipennis*) constituent un lieu d'élection pour les pontes des Anophélines. Ce sont des algues vertes filamenteuses, appartenant (d'après le professeur R. Maire) à trois familles : *Spirogyres*, *Conferves* et *Cladophores*.

Grand nombre d'Anophélines dans les régions où le paludisme a revêtu un caractère épidémique particulièrement intense. — Dans les régions où le paludisme a été particulièrement violent en 1916 et 1917, on a observé un nombre incalculable et exceptionnel d'Anophélines. *Exemples* : dans la Mitidja, en 1916, en Oranie, en 1917.

Pyretophorus myzomyifacies, à Mac-Mahon. — Une variété de *Pyretophorus myzomyifacies* déjà signalée dans le Sahara et sur le littoral (1) a été trouvée en 1916 par le Dr Parrot, à Mac-Mahon (versant saharien du Haut-Pays constantinois), altitude : 950 mètres.

« La tache située à la base de la fourche de la première nervure longitudinale est beaucoup plus petite que les taches correspondantes de la costale et de la sous-costale, et se trouve au niveau de l'extrémité apicale de ces taches de la costale et de la sous-costale. »

Remuements de terre et paludisme. — Aucun rapport n'a été observé entre les « remuements de terre » et l'augmentation du paludisme, pendant ces deux années où les observations de paludisme abondaient.

Virus macédonien nouvellement importé et aggravation du paludisme. — De très nombreux paludéens contaminés en 1916 en Macédoine (troupes françaises et serbes) sont venus en Algérie où, pendant de longs mois, leur paludisme tenace a occasionné de multiples rechutes. C'est à tort que l'on a attribué à l'arrivée de ces impaludés d'Orient la cause des épidémies de fièvres graves qui ont eu lieu en Algérie ces deux dernières années. Tout paludéen est évidemment susceptible d'essaimer indirectement son virus autour de lui, mais il n'y a pas eu corrélation entre la distribution géographique du paludisme épidémique de 1916 et de 1917 et la répartition des « Macédoniens ». Bien des localités d'où les « retours d'Orient » étaient absents ont subi néanmoins le contre-coup de l'épidémie générale. On a voulu trouver dans cette arrivée d'un virus importé l'explication de ces réveils agressifs du paludisme, alors que les conditions météorologiques (men-

(1) *Campagne antipaludique* de 1909. Alger, Imprimerie algérienne, 1910, p. 118-119.

tionnées plus haut) suffisaient à les expliquer. Les recrudescences locales de 1916 et 1917 ne diffèrent d'ailleurs pas des recrudescences périodiques que nous signalons depuis 1902 en Algérie.

* * *

II. — RÉSERVOIR DE VIRUS

1° *Tableaux des index endémiques.*

INDEX ENDÉMIQUES SPLÉNIQUES RELEVÉS EN 1916.

			Nombre de grosses rates	Proportion
Enfants :	De 0 à 5 ans.	25 sur 300	400 sur 895	44,6 p. 100
	De 6 à 10 ans.	335 sur 500		
	De 11 à 15 ans.	40 sur 95		
Adultes au-dessus de 15 ans			34 sur 202	16,8 p. 100
		Totaux.	434 sur 1.097	39,5 p. 100

Ces rates ont été palpées en 1916 dans les localités suivantes :

Département d'Alger : Attatba, Baba-Ali, Birtouta, Boufarik, Bourkika, Bouyageub, Chéragas, Maison-Carrée, Marengo, Montebello, Mtâ-el-Habous, Retour-de-la-Chasse.

Département d'Oran : Debrousseville, Fermeblanche.

Département de Constantine : Mondovi, Saint-Paul, Taher.

INDEX ENDÉMIQUES SPLÉNIQUES RELEVÉS EN 1917.

			Nombre de grosses rates	Proportion
Enfants :	De 0 à 5 ans.	98 sur 151	271 sur 486	55,7 p. 100
	De 6 à 10 ans.	111 sur 258		
	De 11 à 15 ans.	62 sur 77		
Adultes au-dessus de 15 ans			32 sur 123	26,1 p. 100
		Totaux.	303 sur 609	49,7 p. 100

Ces rates ont été palpées en 1917 dans les localités suivantes :

Département d'Alger : Attatba, Baba-Ali, Benimered, Berrouaghia, Birtouta, Bourkika, Bouyagueub, Chéragas, Marengo, Montebello, Retour-de-la-Chasse, Saint-Cyprien.

Département d'Oran : Debrousseville, Fermeblanche, Sainte-Léonie, Tourville.

Département de Constantine : Mondovi.

2° Tableau des résultats des examens microscopiques du sang des sujets habitant des localités paludéennes.

NOMBRE D'EXAMINÉS en 1916		PARASITÉS PAR L'HÉMATOZOAIRE			CORPS en DEMI-LUNE	CORPS en PESSAIRE	AVEC grosse RATE
		Tierce bénigne	Tierce maligne	Quarte			
Fébricitants	150	75	43	4	12	14	129
Non-fébricitants	235	56	25	»	4	8	136
Totaux	385	131	68	4	16	22	265
		203					

[8 fois infection simultanée par tierce bénigne et par tierce maligne.]

NOMBRE D'EXAMINÉS en 1917		PARASITÉS PAR L'HÉMATOZOAIRE			CORPS en DEMI-LUNE	CORPS en PESSAIRE	AVEC grosse RATE
		Tierce bénigne	Tierce maligne	Quarte			
Fébricitants	30	15	5	1	2	1	25
Non-fébricitants	45	8	»	»	1	3	20
Totaux	75	23	5	1	3	4	45
		29					

[3 fois infection simultanée par tierce bénigne et par tierce maligne.]

3° *La mobilisation* a été une cause de dissémination du virus paludéen L'installation de camps, de postes militaires, dans des localités malsaines, a causé de nombreuses victimes.

4° *Rechutes préépidémiques.* — De nombreuses rechutes se sont produites en 1916 à Montebello au mois de mars, à l'occasion des premières chaleurs du printemps.

5° *La fièvre bilieuse hémoglobinurique*, complication grave du paludisme, n'a pas été signalée souvent durant ces deux années.

ÉTUDES PROPHYLACTIQUES

1° La *mobilisation* d'une partie du personnel n'a pas permis l'exécution complète des mesures antilarvaires, et en certains cas a nécessité l'interruption totale de la quininisation. Le prix extraordinaire de la quinine et du pétrole, les salaires excessifs qu'exigent les ouvriers des chantiers antilarvaires ont rendu difficile l'exécution des mesures d'assainissement. Malgré l'absence, de décembre 1916 à février 1917 et de septembre à novembre 1917 du chef du Service antipaludique envoyé en mission à l'armée d'Orient, la lutte antipaludique a été poursuivie, en 1916 et en 1917, dans les mêmes localités que les années précédentes et dans six nouvelles en 1916, quatre nouvelles en 1917.

2° La *quininisation des indigènes*, qui a pour but l'amendement du réservoir de virus, a été effectuée en 1916 et 1917 par 18 agents, dont 7 femmes en 1916 et 8 femmes en 1917.

3.500 personnes environ, dont la plupart sont indigènes, ont été quininisées par des *agents quininisateurs.*

Trente-trois *institutrices et instituteurs* en 1916, une vingtaine en 1917, ont fait prendre la quinine à leurs élèves à l'école (de 500 à 600 enfants, en majorité européens).

La quinine du Service antipaludique est employée sous forme de *dragées* à 20 centigrammes de bichlorhydrate. 205 kilogrammes de dragées, soit 82 kilogrammes de quinine, ont été utilisés en 1916, et 261 kilogrammes de dragées, soit 90 kil. 350 de quinine, en 1917. Pour les jeunes enfants est employée avec succès la *chocolatine* de quinine : 14.000 chocolatines ont été utilisées en 1916, soit 2 kil. 100 de tannate de quinine et 700 grammes de sulfate de quinine, et en 1917, 35.893 chocolatines, soit 1 kil. 506 de sulfate et 260 grammes de chlorhydrate de quinine.

On a dû employer en 1917 du chlorhydrate de quinine, le tannate et le sulfate faisant défaut. Les doses de médicament sont, respectivement, par chocolatine :

Tannate	0 gr. 15
Sulfate	0 gr. 05
Chlorhydrate	0 gr. 045

La quininisation préventive et curative des indigènes est faite à la dose de 40 centigrammes pour un adulte, et, selon les localités et les possibilités, tous les jours, ou tous les 2 jours, ou tous les 3 jours, ou tous les 4 jours. Dans ces 3 derniers cas, la dose pour un adulte est portée à 60 centigrammes. La quininisation dure en général, dans le Tell, 7 mois : du 1er mai au 30 novembre. Les observations faites depuis 1906, et particulièrement pendant l'année 1916, année d'épidémie très violente dans le département d'Alger, permettent d'arriver aux conclusions suivantes :

A. En temps ordinaire, la *quininisation* des indigènes au moyen d'agents européens, même lorsqu'elle n'est faite que tous les 2 jours ou même tous les 4 jours, peut avoir un bon résultat;

B. En temps d'épidémie, elle est insuffisante ;

C. En temps d'épidémie, la quininisation *quotidienne* commencée à temps est efficace.

3° Les « *petites mesures antilarvaires* » ont été appliquées dans les trois champs de démonstration, bimensuellement, sur près de 20 kilomètres d'oueds, canaux, bords de marécages. A Arlal et au domaine de l'Habra (dans le département d'Oran), à Brazza et Tablat (dans le département d'Alger), à Robertville et à Penthièvre (dans le département de Constantine), elles ont donné d'excellents résultats. Dans les localités où elles ont dû être interrompues cette année faute de personnel, le paludisme a de nouveau fait des victimes (région de l'ancien lit de l'Oued-Djer).

Par suite de la pénurie momentanée de pétrole, le Service antipaludique a essayé d'utiliser un pétrole recueilli en Algérie, près de Relizane (Tliouanet), sous forme de pétrole brut et de mazout. Malgré le prix de revient plus faible de ces deux produits à dose efficace contre les larves de moustiques, l'emploi du pétrole lampant est plus commode en ce qui concerne le mazout, et moins dangereux en ce qui concerne le pétrole brut.

4° Les moyens de *défense mécanique des habitations* (grillages aux portes et fenêtres) sont entretenus par les administrations, surtout celles des chemins de fer, et, dans certains cas, par les communes.

5° Les moyens de *propagande* employés en 1916 et en 1917

ont été la distribution de tracts et de brochures et les visites aux écoles.

I. — CHAMPS DE DÉMONSTRATION

Résumé des 13e et 14e campagnes a Montebello (département d'Alger).

Protégés : Européens, une centaine; indigènes 200 environ. En 1916, on s'est trouvé en face de circonstances tout à fait exceptionnelles; comme nous l'avons exposé plus haut, la cuvette du lac Halloula, voisin de Montebello, s'est remplie au début de l'été, par suite de pluies exceptionnelles, d'une façon anormale : une surface d'eau presque stagnante, de 700 hectares, a constitué un immense et inaccessible gîte à Anophélines. Aucune mesure antilarvaire ne s'est trouvée possible à ce moment, et l'on a dû assister, impuissant, à l'éclosion de myriades d'Anophélines, et, consécutivement, à une épidémie de paludisme qui a atteint presque tous les habitants du village. La quininisation des indigènes les plus proches du village était faite tous les trois jours au début de l'été : il a fallu l'effectuer quotidiennement pour que le virus s'atténue. En 1917, la quininisation quotidienne fut commencée de bonne heure (15 mars); il fut possible de pratiquer les mesures antilarvaires : les fièvres, suite de l'épidémie de l'année précédente, furent, à Montebello, beaucoup moins graves et beaucoup moins répandues. Des cas isolés se sont produits en automne, par suite de l'interruption des mesures antilarvaires, causée par le départ à l'Armée du garde-canaux.

Témoins : En 1916 et en 1917, très nombreux cas dans tous les environs.

Résumé des 11e et 12e campagnes a Tourville et Sainte-Léonie.

Protégés : Européens, 2.000 environ; indigènes, 500. En 1916, la population sédentaire est restée totalement indemne. En 1917 (année d'épidémie en Oranie) les cas de paludisme n'ont été constatés que chez les ouvriers qui s'étaient infectés aux environs.

Témoins : A Port-aux-Poules, cas très nombreux et très graves, comme dans presque tout le département d'Oran.

Résumé des 10e et 11e campagnes a Mondovi.

Protégés : 1.500 Européens environ; 1.500 indigènes. Le paludisme subit une régression très nette à Mondovi; on n'y constate plus que de rares cas de première invasion (2 en 1917). Malgré les difficultés de la lutte contre les fièvres à Mondovi, le virus s'atténue (en 1917 l'index endémique est de 20 p. 100) et les Européens ne sont plus décimés comme ils l'étaient avant l'organisation.

Témoins : Au contraire, dans les agglomérations voisines où la défense n'est pas instituée (Barral, Guébar), la population est profondément impaludée, l'index endémique a été de 30 à 40 p. 100, et la proportion des cas de première invasion a été de 2 à 3 p. 100.

II. — AUTRES CAMPAGNES ANTIPALUDIQUES

La lutte s'est poursuivie dans plusieurs autres localités dont 10 nouvelles (6 en 1916 et 4 en 1917) sur la demande des intéressés ou des médecins, et sous la surveillance de ces derniers :

MESURES ANTILARVAIRES ET QUININISATION.

Département d'Oran : Arlal et Domaine de l'Habra.
Département d'Alger : Brazza et Tablat.
Département de Constantine : Penthièvre, Rebertville et Saint-Paul.

QUININISATION SEULE.

Département d'Oran : Pont-de-l'Isser.
Département d'Alger : Attatba, Baba-Ali, Beni-Messous, Birtouta, Bourkika, Bouyagueub, Coléa, Ferme Juba, Fort-de-l'Eau, Harrach, Les Heumiss, Marengo, Mtâ-el-Habous, Région de l'ancien lit de l'Oued-Djer, Rouina, Saint-Cyprien.
Département de Constantine : Biskra, El-Akbia, Jemmapes, Siliana.

Le Service antipaludique a obtenu du ministre de la Guerre la cession gratuite de 300 kilos de chlorhydrate de quinine qui permettront, en 1918, une plus grande extension de la quininisation.

III. — ENQUÊTES

Des demandes d'enquête ont été adressées au Service antipaludique; en 1916, 31 dont 8 demandées par différentes administrations, 6 par des municipalités, 7 par des médecins, 10 par des particuliers; en 1917, 26 dont 4 demandées par des municipalités, 6 par des médecins, 16 par des particuliers.

A la suite d'une enquête du Service antipaludique établissant les conditions épidémiologiques d'une région fiévreuse de la vallée de la Seybouse, une « Association syndicale libre » s'est constituée à Bône, entre les propriétaires de grands domaines, dans le but d'assainir la région entourant la gare de Saint-Paul.

*
* *

Nous devons signaler enfin que la campagne antipaludique instituée à l'armée d'Orient en 1917, à la suite de missions des

chefs du Service antipaludique algérien, et conformément à leurs indications, a obtenu un excellent succès. Grâce à la grande activité dévouée de la mission antipaludique permanente qu'ils ont fait organiser à l'armée d'Orient, l'année 1917 a été pour les troupes de Macédoine infiniment moins fiévreuse que l'année 1916, non seulement par le nombre, mais par la gravité des cas (1). Cet heureux résultat témoigne en faveur des méthodes élaborées par le Service antipaludique algérien.

IV. — CHEMINS DE FER

Les Compagnies des Chemins de fer algériens ont continué à faire profiter des mesures antipaludiques leurs agents des gares et maisonnettes fiévreuses.

* * *

Ce nous est un devoir agréable d'adresser ici nos vifs remerciements à nos confrères collaborateurs, à l'administration supérieure, aux administrations départementales et communales, aux ingénieurs et agents des ponts et chaussées et des chemins de fer, aux institutrices et aux instituteurs. Les agents du Service antipaludique, inspecteur et agents, quininisatrices et quininisateurs, qui ont été des auxiliaires précieux, ont assuré leur service avec le dévouement qu'il exige.

(1) Voir les Comptes rendus de cette mission dans le *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, t. XI, juin 1918, p. 456-574 et juillet 1918, p. 641-648 [Edm. et Ét. Sergent : La prophylaxie antipaludique d'une armée en campagne (Armée d'Orient 1917)].

RECHERCHES SUR LE SÉRUM DE LA MURÈNE

(*MURÆNA HELENA* L.)

par W. KOPACZEWSKI.

On savait, d'après les travaux de Phisalix et Bertrand [1], que le sang de la vipère est toxique. La même constatation a été faite par Calmette [2] et ses élèves pour d'autres serpents venimeux. Mosso [3] a prouvé que le sang d'anguille possède également des propriétés toxiques. On trouve dans la littérature une indication vague sur la toxicité du sang des murénides [4].

Des expériences inédites faites par Vissacovitch en 1905 au laboratoire de zoologie maritime à Villefranche-sur-Mer, et qui m'ont été obligeamment communiquées par M. Davydoff, il résultait que le sang des murénides injecté dans la veine marginale du lapin provoque la mort rapide. Après la publication de mes premières notes, M. Portier a bien voulu m'indiquer un travail fait sous sa direction par Cosmovici [5] ou quelques précisions sur la dose toxique en injection intrajugulaire ont été apportées.

Profitant, comme médecin militaire, d'une convalescence à Monaco je repris l'étude de la toxicité du sang des murénides, en prenant comme type la murène.

Dans les conditions difficiles pour toutes les recherches scientifiques, j'étais profondément ému par l'intérêt très particulier qui m'a été témoigné par S. A. S. le prince de Monaco.

Je suis bien sincèrement reconnaissant au distingué et savant directeur du Musée océanographique, M. Richard, qui a mis à ma disposition toutes les ressources de l'établissement; je n'oublie pas les précieux conseils photographiques de son préparateur, M. Oxner.

Les propriétés toxiques du sérum.

Voici comment nous avons procédé pour obtenir le sérum :

Une murène de 85 centimètres de longueur et d'un poids de 2.100 grammes est clouée vivante sur une planche; le cœur est dénudé, On fait une ligature sur la partie étroite du bulbe aortique (*bulbus arteriosus*), qui aussitôt commence à se gonfler; par un point cautérisé on introduit une canule formée d'un tube à essais effilé latéralement, et stérilisé. Le sang afflue dans le tube; à la fin de l'opération on incline la planche, de façon que la tête de la murène soit plus bas, et on aspire : les dernières gouttes de sang sont récupérées. Une telle murène fournit environ 30 cent. cubes de sang. La coagulation du sang est souvent très lente et se fait par étapes ; pour l'accélérer on ajuste la canule du tube, contenant le sang récolté, à un dispositif permettant d'aspirer l'air, préalablement filtré à travers du coton et traversant une solution d'acide sulfurique pur. Ce dispositif est facile à imaginer; un flacon laveur en est le modèle le plus simple. La coagulation du sang se poursuit alors rapidement il suffit d'une heure pour avoir un sérum légèrement jaunâtre et absolument transparent. Pour récupérer tout le sérum on introduit dans le tube un poids d'un diamètre approprié préalablement stérilisé : la pression qu'il exerce fait sortir le sérum du caillot.

De cette façon on récolte environ environ 15 cent. cubes d'un liquide légèrement jaunâtre et opalescent.

Des expériences, dont le détail a été publié ailleurs [25], ont permis de constater que la dose de 0 c.c. 05 est mortelle pour un cobaye en injections intraveineuses. Étant donné que le sérum expérimenté contient 8,37 p. 100 de matières sèches, dont 0,39 p. 100 de cendres, on peut calculer que la dose mortelle correspond à 4,19 milligrammes de matières solides. La dose mortelle est naturellement sensiblement plus élevée en injections intrapéritonéales ou sous-cutanées et la survie plus longue.

Plusieurs auteurs [6] ont observé des variations sensibles dans la toxicité du sang des poissons telles que le congre, l'anguille, suivant la saison, l'état général, etc.; pour notre part nous n'avons jamais pu constater de variations appréciables. La dose de 0 c.c. 1 pour un cobaye de 300 à 500 grammes était toujours mortelle.

Nous avons fait ensuite des essais sur d'autres animaux afin d'examiner leur sensibilité vis-à-vis du sérum de la murène, notamment sur des lapins et des chiens. Il en résulte que la

dose mortelle, calculée par kg-corporel est de 0 c. c. 2 pour l cobaye, de 0 c. c. 15 pour le lapin et de 0 c.c. 1 de sérum pou le chien. La dose de 0,15 par kg-corporel a été constatée pa Cosmovici [5] pour le lapin.

L'intoxication est presque foudroyante avec les doses élevée de sérum. Avec des doses moins fortes, on constate aussitôt d la faiblesse; l'animal s'affaisse, sa respiration devient gênée e il succombe après avoir été secoué de crampes violentes.

A l'autopsie des animaux expérimentés en injections intra veineuses nous avons trouvé le tableau suivant : le cœur es arrêté en diastole et il regorge de sang, liquide encore au bou de 20 minutes; les poumons sont complètement rétractés et pré sentent plusieurs taches hémorragiques; la rate et le foie so normaux; la vésicule biliaire regorge de bile; l'estomac et le intestins sont gonflés d'air et fortement dilatés.

Les animaux, examinés après l'intoxication par le sérum e injection sous-cutanée, présentent des symptômes différent analogues à ceux qu'on observe chez les animaux tués pa injection sous-cutanée ou intraveineuse du venin de la murèn Nous en parlerons plus loin.

Les propriétés physiologiques du sérum.

Après avoir mis en évidence les propriétés toxiques d sérum de la murène nous avons étudié ses propriétés physi logiques, savoir : l'hémolyse, la bactériolyse, la précipitation l'agglutination.

Le sérum obtenu par le procédé indiqué plus haut a é dilué de son volume d'eau salée à 8 p. 1.000. Les globul rouges du cobaye, lavés trois fois, en suspension à 1 p. 10 (1 cent. cube), ont été mélangés à des doses croissantes d sérum normal et le volume a été complété à 2 cent. cubes av de l'eau salée. Ces mélanges ont été portés à l'étuve de 37.

La dose de 0 c.c. 2 de sérum provoque l'hémolyse com plète [25].

Nous avons chauffé le sérum normal pendant 1/4 d'heure 56° et répété les mêmes expériences. Toute action hémol tique a disparu.

Nous nous demandâmes alors si l'addition de lécithine aurai

pour effet de rendre au sérum ses propriétés hémolytiques. On a donc ajouté aux mélanges ci-dessus 0 c.c. 5 d'une solution de lécithine à 1 p. 10.000 préparée par dissolution de 1 gramme de lécithine pur d'œuf dans 100 cent. cubes d'alcool méthylique pur et dilution de 1 cent. cube de cette solution dans 100 cent. cubes d'eau salée. En portant les tubes de nouveau à l'étuve, on constate au bout d'une heure que l'hémolyse n'a pas eu lieu et que la solution de lécithine ne peut donc nullement remplacer le complément détruit par le chauffage.

Nous avons essayé si le sérum de la murène possède des propriétés bactériolytiques.

Nous avons constaté que le sérum est sans effet pour les espèces microbiennes étudiées : *Bacillis subtilus*, bacille typhique (Institut Pasteur) et *B. Coli*. Seul le *Staphylococcus aureus* est dissous après un contact de 8 heures, à 37°.

Les expériences sur les propriétés lytiques du sérum de la murène nous ont permis de constater qu'il ne possède pas de propriétés ni précipitantes, ni agglutinantes. Par contre, il agglutine les cultures jeunes (24 à 48 heures) des microbes vivants typhiques précités ajoutés en proportion de 1 p. 60 d'une suspension de la culture sur la gélose inclinée à 10 cent. cubes de sérum physiologique.

Les propriétés physiques du sérum.

Après avoir étudié les propriétés physiologiques du sérum de la murène nous allons étudier ses propriétés physiques, savoir : les caractères physiques généraux, et l'action qu'exercent sur lui le temps, la lumière, la température, l'absorption, la dessiccation et la dialyse.

Caractères physiques. — Le sérum de la murène, obtenu par le procédé indiqué, est un liquide absolument transparent, opalescent et d'une couleur jaune d'or pâle. Desséché dans le vide à la température du laboratoire (27 à 30° C.), ce sérum a montré une teneur moyenne en matières sèches de 8,41 p. 100, dont 0,34 p. 100 de cendres. Sa densité moyenne est de 1,0192 à 27° C.

Sa tension superficielle, mesurée à l'aide d'un stalagmomètre de Traube avec lequel il donne 93,5 gouttes (H^2O à 27° C. — 55, 25 gouttes) est de 45,18 dynes à 27° C.

Stabilité. — Le sérum est mis en ampoules stériles et scellées, conservé un temps variable à l'abri de la lumière du jour ; au bout d'un certain temps on éprouve sa toxicité chez les cobayes en injections intrajugulaires.

1.	Sérum conservé	5 jours.	Cob. 425 gr.	0 c.c. 1	Secousses violentes ; mort en 5 minutes.
2.		10 jours.	Cob. 275 gr.	0 c.c. 1	Secousses violentes ; mort 1 minute après.
3.		20 jours.	Cob. 410 gr.	0 c.c. 1	Secousses, convulsions et mort au bout de 1 min.
4.		30 jours.	Cob. 575 gr.	0 c.c. 1	Dyspnée ; 5 minutes après, quelq. secousses; toux, tremblements, polyurie Survie.
5.		30 jours.	Cob. 480 gr.	0 c.c. 2	Secousses viol. au bout de 2 minutes. Polypnée. Au bout de 10 minutes, nouvelles secousses. Se remet lentement, survit.

A l'encontre des faits observés par Cosmovici, Gley et Camus, Grimard et Dumarest, nous constatons l'extraordinaire stabilité du sérum au point de vue toxique.

Influence de la lumière. — Pour éviter l'action de la température nous avons plongé les ampoules scellées de sérum dans des cuvettes remplies d'eau; cette eau était changée de façon à ne jamais dépasser la température de 30° C. Les ampoules ont été exposées pendant 12 heures par jour aux rayons solaires; 48 heures d'irradiation affaiblissent notablement la toxicité [25].

Pour préciser quelles sont les radiations qui exercent cette destruction nous avons soumis le sérum à l'influence des rayons ultra-violets. Nous avons soumis notre sérum à l'influence des rayons X ensuite. Voici les caractéristiques de notre expérimentation.

Comme source des rayons ultra-violets, nous avons choisi tout d'abord la lampe U-viol de Zeiss, qui fournit des rayons très purs de longueur d'onde entre 400 et 300 $\mu\mu$. La lumière d'un arc de charbon-fer passe par un filtre double en verre U-viol; le premier filtre contient du sulfate de cuivre à 20 p. 100 ; le second une solution à 1 p. 10.000 de nitrosodiméthylaniline. Le sérum a été exposé soit en ampoules de verre scellées, soit en cuvettes en quartz, sans qu'on puisse observer une différence quelconque. Les ampoules ou les cuvettes se trouvaient à une distance de 17 centimètres de la source lumineuse et immédiatement contre la paroi du filtre.

Le temps d'irradiation a varié entre 30 et 270 minutes. Au bout de ce temps on vérifiait la toxicité et nous avons constaté que ces rayons n'avaient exercé aucune action destructive. Nous avons eu recours à une source lumineuse beaucoup plus forte et fournissant les radiations ultra-violettes d'une longueur d'onde allant jusqu'à 224 $\mu\mu$ [8].

Nous nous sommes servi d'une lampe à vapeur de mercure en quartz de Cooper Hewitt, marchant sur 275 volts et 2,5 ampères; son intensité lumineuse est d'environ 8.000 bougies. Le sérum a été mis dans une cuvette en quartz, fermée avec du collodion et placée à 5 centimètres du coude de la lampe, le tout dans un courant d'eau froide.

Dans ces conditions, l'action destructive des rayons ultra-violets est manifeste [25].

D'après les observations de Victor Henri [7] le sérum absorbe les rayons ultra-violets d'une longueur d'onde au-dessous de 290 $\mu\mu$. Nous constatons également pour le sérum de la murène que cette absorption sélective a eu lieu.

Nous avons ensuite soumis notre sérum à l'influence des rayons X; voici les caractéristiques de notre expérimentation.

Le sérum a été irradié soit en ampoules de verre scellées, soit en cuvettes de quartz, placées à une distance de 25 centimètres de l'anticathode; l'ampoule marchait soit sous 1, soit sous 4 milliampères; la longueur d'étincelle était de 7,8 centimètres; la dureté de l'ampoule égale d'environ 5 Benoist.

Le temps d'exposition variait de 6 minutes sous 4 milliampères et 30 à 60 minutes sous 1 milliampère. Au bout de ce temps aucun affaiblissement dans la toxicité n'a été décelé.

Influence de la température. — Nous avons d'abord étudié l'influence des congélations successives, puis celle de la température de 56° C. et de la température d'ébullition; ensuite de la température de 65° C. et 75° C., afin de préciser davantage le point où disparaissent les propriétés toxiques du sérum.

1.	Sérum congelé 3 fois.		Cob. 520 gr.	0 c.c. 1	Mort instantanée.
2.	Sérum chauffé 15 minutes	à 56° C.	Cob. 425 gr.	0 c.c. 2	Mort instantanée.
3.		à 56° C.	Cob. 610 gr.	0 c.c. 1	Convulsions; toux; dyspnée légère. Survie.
4.		à 65° C.	Cob. 525 gr.	0 c.c. 5	Quelques sursauts. Survie.
5.		à 75° C.	Cob. 570 gr.	0 c.c. 5	Toux; dyspnée; paralysie passagère. Survie.
6.	Sérum porté à l'ébullition.		Cob. 440 gr.	0 c.c. 5	Pas de réaction caract.
7.			Cob. 500 gr.	0 c.c. 8	Pas de réaction caract.

Nous constatons donc que les propriétés toxiques, quoique affaiblies très fortement, persistent après le chauffage de 15 minutes à 65° C, tandis que les propriétés hémolytiques n'existent plus, ainsi que nous l'avons signalé; il n'y a donc aucun parallélisme entre ces deux phénomènes.

Absorption. — Parmi les poudres nous avons étudié le noir animal et le kaolin purs exempts de cendres, ajoutés dans la proportion de 15 p. 100 au liquide et une suspension de gélose à 2 p. 100. Nous avons constaté que le sérum a conservé entièrement ses propriétés toxiques.

Dessiccation. — On dessèche 2 cent. cubes du sérum frais dans le vide à 27° C. Au bout de 36 heures on suspend la substance jaunâtre qui se détache en paillettes dans 2 cent. cubes d'eau distillée et on éprouve la toxicité :

Cob. 240 gr.	0 c.c. 1	Convulsions au bout de 2 minutes; dyspnée. Survie.
Cob. 230 gr.	0 c.c. 2	Convulsions violentes; dyspnée; convulsions nouvelles. Mort en 10 minutes.
Cob. 200 gr.	0 c.c. 3	Mort instantanée.

Influence de la dialyse. — Voici les détails techniques : on prélève aseptiquement 10 cent. cubes de sérum de murène, on les place dans un sac de collodion à 6 p. 100 et on les dialyse dans un dialyseur analytique de Kopaczewski [8], le tout parfaitement stérilisé. La dialyse s'effectue dans l'eau courante très pure; elle est terminée après 36 heures, comme prouve l'évaporation d'eau extérieure inchangée depuis 12 heures. La condensation de la partie dialysable se fait à 40-45° C.

Le sérum dialysé est ramené à son volume primitif par la concentration dans le vide, — ainsi que la partie dialysable. On éprouve leur toxicité.

1. Cob. 440 gr.	0 c.c. 1	Quelques secousses; dyspnée. Survie.
2. Cob. 480 gr.	0 c.c. 2	Convulsions; très forte dyspnée; nouvelles secousses. Survie.
3. Cob. 520 gr.	0 c.c. 5	Convulsions et mort en 8 minutes.
4. Cob. 470 gr.	0 c.c. 8	Mort instantanée.

La toxicité de la partie dialysable a été nulle.

Nous avons précipité le sérum dialysé par 3 volumes d'alcool absolu : il se forme alors un précipité abondant, volumineux. Ce précipité, mis en suspension dans l'eau salée à 7,5 p. 100, est complètement dépourvu de toxicité. Par contre, le filtrat

pendant la concentration dans le vide laisse séparer une substance jaune résineuse; cette suspension est encore toxique.

1. Cob.	440 gr.	0 c.c. 2	Inquiétude ; paralysie; dyspnée. Survie.
2. Cob.	500 gr.	0 c.c. 5	Quelques secousses assez fortes ; dyspnée. Survie.
3. Cob.	450 gr.	1 c.c. 0	Convulsions violentes ; couché sur le côté ; se remet. Survie.

Si on filtre maintenant cette suspension, le nouveau filtrat obtenu est inoffensif, mais la substance résineuse, redissoute dans quelques gouttes d'alcool et ramenée à son volume initial avec de l'eau distillée, est toxique, quoique toutes ces opérations aient fortement diminué la toxicité primitive.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'étudier l'influence de la précipitation par l'alcool sur la toxicité du sérum normal non dialysé.

Influence de la précipitation par l'alcool.

Voici comment on a opéré :

Nous précipitons 15 cent. cubes de sérum de la murène par le même volume d'alcool absolu ; il se forme un précipité jaune orangé très abondant, caséeux; on filtre et on lave le précipité formé à plusieurs reprises avec de l'alcool absolu; on recueille à part l'alcool de lavage. Le filtrat alcoolique est additionné d'un nouveau volume d'alcool de lavage, il se forme de nouveau un précipité mais peu abondant. Après la quatrième addition d'alcool il s'est produit un trouble uniforme mais excessivement léger. Le précipité total et le filtrat sont placés dans les exsiccateurs à vide. Le filtrat est ramené au volume primitif; le précipité alcoolique est redissous dans 15 centimètres de la solution physiologique à 7,5 p. 100.

Par la précipitation alcoolique le sérum perd 2,85 p. 100 de ses substances sèches, composées presque entièrement de matières organiques (0,4 milligramme de cendres pour 0,1432 gramme de matières sèches).

Le filtrat alcoolique précipite spontanément pendant la concentration dans le vide. Il se forme un précipité jaunâtre résineux qui, par trituration à 37° C., donne une suspension trouble mais uniforme.

On éprouve la toxicité de ces deux liquides par l'injection intrajugulaire chez le cobaye.

Sérum de la murène débarrassé de son précipité alcoolique (filtrat I) :

1. Cob. 420 gr. 0 c.c. 2 Toux; polypnée; émission d'urine. Survie.
2. Cob. 510 gr. 0 c.c. 5 Toux; quelques petites secousses. Survie.
3. Cob. 360 gr. 1 c.c. 0 Secousses faibles, mais répétées. Mort en 10 min.

Précipité alcoolique redissous :

1. Cob. 500 gr. 0 c.c. 5 Pas de symptômes appréciables.
2. Cob. 420 gr. 1 c.c. 0 Pas de symptômes appréciables.

La suspension toxique (filtrat I) troublée par concentration est filtrée à nouveau; le précipité est dissous dans l'alcool à 40°; on obtient un nouveau filtrat (filtrat II) opalescent et une solution jaunâtre limpide; on éprouve leur toxicité :

Filtrat II . . .	Cob. 500 gr.	0 c.c. 6	Pas de symptômes appréciables.
	Cob. 380 gr.	1 c.c. 2	Pas de symptômes appréciables.
Précipité jaune redissous . .	Cob. 460 gr.	0 c.c. 6	Polypnée; tremblements; incontinence d'urine. Survie.
	Cob. 400 gr.	1 c.c. 2	Torpeur passagère; démangeaisons; tremblements; polypnée; petits sursauts répétés. Survie.

Il va sans dire que l'alcool à 40° injecté en quantité équivalente n'a provoqué aucun de ces troubles.

Si on continue la concentration dans le vide jusqu'à la dessiccation complète et si on éprouve ensuite la toxicité de la substance jaune amorphe obtenue et suspendue dans le volume primitif d'eau distillée, on peut constater que toute toxicité a disparu.

Cob. 450 gr. 1 c.c. 0 de la suspension. Pas de réactions caractéristiques.
Cob. 400 gr. 2 c.c. 0 de la suspension. Pas de réactions caractéristiques.

En examinant les propriétés hémolytiques du sérum ainsi modifié, nous avons constaté que ces propriétés sont marquées par contre dans le précipité alcoolique redissous dans la solution physiologique. Dans nos conditions habituelles d'expériences il s'est produit une hémolyse nette avec des doses de 0 c.c. 75 et 1 c.c. 0 au bout de 3 heures de contact à 40° C.

Le sérum débarrassé de son précipité alcoolique, ramené à son volume primitif et à la condition d'être ajouté en faible quantité aux globules rouges, possède toutefois des propriétés hémolytiques : ainsi 0 c. c. 2 de liquide hémolyse 1 c. c. 0 de globules rouges du cobaye à 1 p. 100 au bout de 30 minutes de contact à 40°; mais en proportion plus forte il s'est produit un précipité jaune brun uniforme. On filtre ce précipité et on constate que les filtrats sont presque décolorés, donc une précipitation s'est produite aux dépens des hématies.

Après avoir fixé les propriétés essentielles physiques et physiologiques du sérum de la murène, nous nous sommes proposé d'essayer d'immuniser des animaux d'expérience contre sa toxicité.

Essais d'immunisation.

Nous avons essayé d'immuniser des cobayes, mais, malgré toutes les précautions, la 2e ou la 3e injection hypodermique ont été suivies de mort, quoique la dose injectée atteignît à peine la dose mortelle. En espaçant les injections nous avons eu le choc anaphylactique. Ainsi une injection intraveineuse de 0 c.c. 05 du sérum de murène, suivie après 11 jours d'intervalle d'une autre de 0 c.c. 01 du sérum, a provoqué la mort instantanée.

Nous avons repris nos essais avec des lapins et après beaucoup de difficultés nous avons réussi à les immuniser contre 15 doses mortelles de la toxicité sérique.

Le tableau de la marche de l'immunisation d'un lapin a été donné dans une publication précédente [25].

Le lapin ayant supporté 15 doses mortelles est sacrifié.

On prélève alors aseptiquement le sang et on obtient environ 15 cent. cubes du sérum antitoxique. Nous avons examiné ses propriétés antitoxiques, savoir : son pouvoir préventif et son pouvoir neutralisant *in vitro*.

Le premier a été essayé en injectant dans la veine marginale de l'oreille des lapins, d'abord du sérum antitoxique et au bout de 30 minutes la dose sûrement mortelle du sérum de la murène dans l'autre veine marginale.

Chez les cobayes les injections ont été pratiqués dans les deux veines jugulaires.

Lap.	2.500 gr.	Sérum antitoxique :	2 c.c.	et sérum toxique :	0 c.c. 4	Dyspnée forte; paralysie. Survie.
Lap.	3.050 gr.		4 c.c.		0 c.c. 4	Pas de symptômes appréciables.
Cob.	310 gr.		0 c.c. 3		0 c.c. 15	Mort instantanée.
Cob.	410 gr.		0 c.c. 75		0 c.c. 15	Au bout de 10 min., convulsions. Mort caractéristique.
Cob.	380 gr.		1 c.c. 50		0 c.c. 15	Quelques sursauts; dyspnée; tremblement. Survie.
Cob.	540 gr.		3 c.c. 0		0 c.c. 15	Polypnée; incontinence d'urine. Survie.

Le pouvoir neutralisant du sérum obtenu a été examiné en mélangeant *in vitro* des doses mortelles (0,4 pour les lapins et 0,15 pour les cobayes) du sérum de murène avec des doses variables du sérum antitoxique. Après un contact de 30 minutes la toxicité des mélanges a été éprouvée en injections intrajugulaires.

Cob. 450 gr.	Mélange en proportion	de 5 doses	du sérum antitoxique	pour 1 dose mortelle.	Mort en 10 minutes.
Cob. 500 gr.		de 10 doses			Dyspnée légère. Survie.
Cob. 580 gr.		de 20 doses			Pas de symptômes caractéristiques.

Tchistovitch [9] a constaté, en immunisant des lapins contre la toxicité du sérum d'anguille, que les propriétés antitoxiques diminuent à mesure que les doses du sérum toxique augmentent et que le maximum du pouvoir antitoxique est atteint avec la quatrième dose. Nous avons immunisé un lapin contre 9 doses mortelles du sérum de murène, et le sérum obtenu possédait à peu près les mêmes propriétés antitoxiques que celui qui en avait obtenu avec les 15 doses mortelles.

Il était très intéressant de vérifier si le sérum antitoxique obtenu possédait des propriétés antivenimeuses. Il nous fallait donc préparer le venin de la murène et étudier ses principales propriétés. Cette étude n'avait pas été faite du tout.

Le venin et ses propriétés.

On savait que la murène possède des dents mobiles qui, en s'enfonçant dans la chair, ouvrent une pochette située autour de la dent et d'où le venin s'écoule. Les morsures de la murène sont, d'après les pêcheurs, qui les craignent, très douloureuses; il paraît qu'elles peuvent occasionner la mort. Mais le venin n'a pas été étudié. Nous avons appliqué une méthode générale d'extraction, que nous avons déjà fait connaître [25].

Le venin obtenu est soluble dans l'eau salée à 7,5 p. 100. On éprouve sa toxicité chez les cobayes par des injections intra-jugulaires.

1. Cob. 325 gr.	5 mg. 0	Secousses cloniques au bout de 2 minutes. Mort en 4 minutes.
2. Cob. 380 gr.	2 mg. 5	Inquiétudes pendant 3 minutes; secousses violentes de plus en plus fortes. Mort en 5 minutes.
3. Cob. 320 gr.	1 mg. 5	Au bout de 2 minutes cris plaintifs; se couche sur le côté; secousses assez fortes; se remet. Survit.
4. Cob. 400 gr.	1 mg. 5	Secousses cloniques persistantes et mort en 10 min.
5. Cob. 440 gr.	1 mg. 0	Polypnée; tremblements. Survie.

Nous n'avons pas pu constater avec des doses très fortes du venin une mort instantanée comme dans les cas d'intoxication par le sérum de la murène.

Nous avons soumis le venin à l'influence d'une température de 56° et nous avons constaté qu'après 15 minutes de chauffage son action n'est pas affaiblie.

Après un chauffage de 15 minutes à 75° on constate encore des propriétés toxiques marquées qui peuvent provoquer la mort; seule l'ébullition abolit les propriétés toxiques du venin.

Si nous examinons ses propriétés hémolytiques, nous constatons que 1 milligramme de venin hémolyse 1 cent. cube d'une solution à 1 p. 100 de globules rouges du cobaye au bout de 30 minutes de contact à 40° C. Les propriétés hémolytiques persistent après chauffage pendant 15 minutes à 56° ou 75°. Nous ne nous croyons pourtant pas autorisé à conclure à un parallélisme entre les phénomènes d'intoxication et d'hémolyse.

Ainsi la dose mortelle du venin est fixée à 1 milligr. 5 pour un cobaye de 400 à 500 grammes.

Pour vérifier si le sérum du lapin immunisé contre 15 doses mortelles de la toxicité sérique de la murène possède des propriétés antivenimeuses, nous avons dissous 0 gr. 15 du venin dans 3 cent. cubes d'eau salée à 7,5 p. 100 et 0 c.c. 1 de cette solution, qui représentait la dose mortelle du venin; nous avons ajouté des quantités variables du sérum antitoxique. Après 30 minutes du contact on éprouvait la toxicité des mélanges en injections intrajugulaires.

Cob. 480 gr.	Mélange de	10 parties	du sérum antitoxique	pour 1 dose mortelle de venin	Secousses violentes et très fréquentes. Mort en 15 minutes.
Cob. 530 gr.	Mélange de	30 parties	du sérum antitoxique	pour 1 dose mortelle de venin	Secousses caractéristiques répétées; polypnée accentuée. Survie.
Cob. 580 gr.	Mélange de	90 parties	du sérum antitoxique	pour 1 dose mortelle de venin	Quelques secousses caractéristiques; tremblements. Survie.

Ainsi nous constatons que les propriétés antivenimeuses du sérum des lapins immunisés contre la toxicité sérique de la murène sont indiscutables, mais beaucoup moins prononcées que ses propriétés antisériques.

L'équilibre moléculaire et la toxicité du sérum.

La rapidité du choc d'intoxication, les symptômes et le tableau à l'autopsie nous ont suggéré l'idée d'un rapprochement entre la toxicité du sérum des poissons et des serpents, d'une part et des phénomènes d'anaphylaxie, d'intoxication par le sang défibriné [**10**] ou par des substances détruisant d'une façon ou de l'autre l'équilibre moléculaire [**11**], d'autre part. Cette idée, nous l'avons signalée dès la première note publiée sur les propriétés toxiques du sérum de la murène. Que les phénomènes anaphylactiques soient d'ordre physique, c'est ce qui est soutenu depuis longtemps par Bordet; et sa théorie physique de l'immunité trouve un nombre toujours croissant d'adhérents [**12**].

Nous avons démontré dans nos travaux sur l'anaphylatoxine [**13**] que, dans le sérum du cobaye rendu toxique par

l'action de la gélose ou des suspensions microbiennes, des changements dans la structure ultra-microscopique ont lieu : les micelles séparées se groupent par plusieurs, en perdant leur mouvement brownien.

Les travaux de A. Mayer [14], Bottazzi [15], Cesana [16] et surtout les recherches d'une grande portée scientifique de Perrin [17] ont attiré l'attention sur les variations d'équilibre micellaire d'où résulte l'apparition de ces agglomérations.

Il nous paraissait donc intéressant d'examiner les relations entre la structure micellaire et la toxicité du sérum de la murène. Chaque fois que le sérum a été soumis à l'influence des agents physiques dont les résultats ont été rapportés ci-dessus, nous avons étudié le sérum à l'ultra-microscope et photographié les images observées.

Voici notre technique expérimentale :

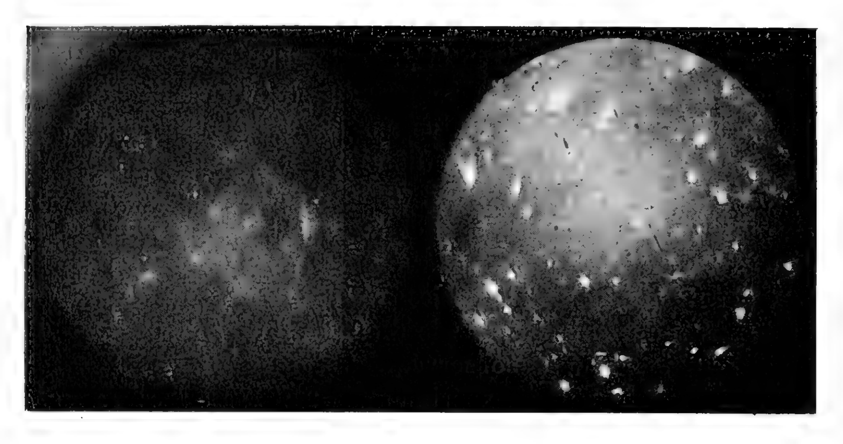
Comme source lumineuse nous avons employé la lampe à arc de charbon de Leitz; les rayons refroidis ont été condensés par 2 lentilles condensateurs. L'appareillage ultra-microscopique était de Zeiss; la chambre en position verticale; le tout bien calibré. Comme objectif nous avons employé l'apochromatique n° 3 de Zeiss, excessivement lumineux, dont le grossissement propre est de 83 diamètres. N'ayant pas à notre disposition d'oculaire à projection, nous l'avons remplacé par l'oculaire compensateur n° 2; le système a été employé à sec; le grossissement final était de 167 diamètres. Le système employé nous a permis de réaliser une grande luminosité et de faire des poses d'une demi-seconde pour les plaques Lumière, « rapidité extrême » (étiquette violette). Pour les observations directes nous avons employé des grossissements allant jusqu'à 2.500 diamètres.

Les liquides examinés ont été soigneusement filtrés et gardés à l'abri des poussières; les préparations ont été faites suivant toutes les précautions d'usage.

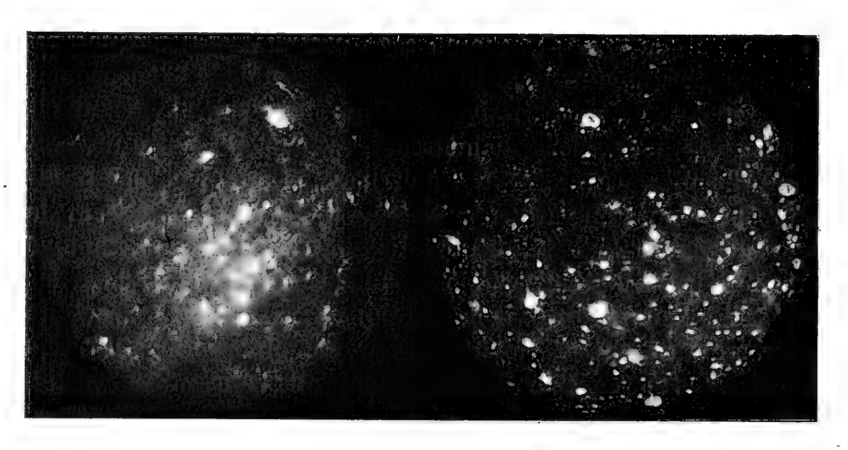
Voici ce que nous avons constaté :

Dans les cas où le sérum a été inactivé, soit par l'action de la température, par les rayons solaires, ou par certains rayons ultra-violets, soit par une conservation prolongée, nous avons observé l'apparition des agglomérations : tout d'abord les micelles séparées et en mouvement vif du sérum normal

(fig. I, 1) se réunissaient par 4-6 pour former finalement soit des gros amas de structure granuleuse, soit des grains très



1. — Sérum normal de la Murène. 2. — Sérum conservé 10 jours.



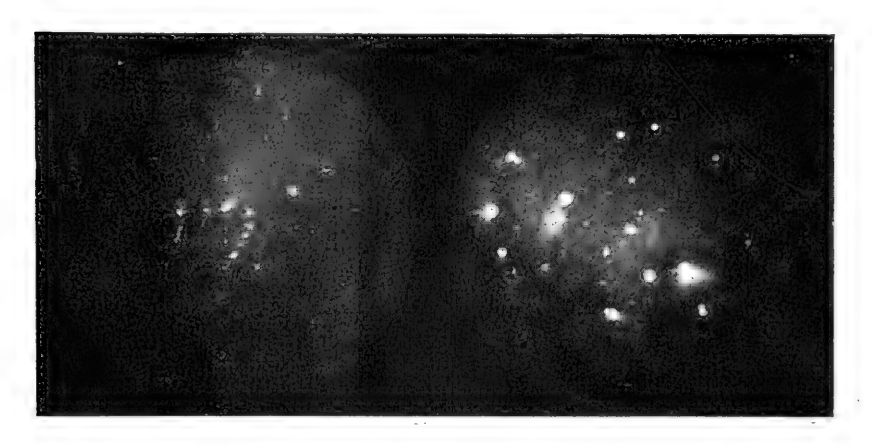
3. — Sérum conservé 20 jours. 4. — Sérum conservé 30 jours.

Fig. 1. — *Influence du temps.*

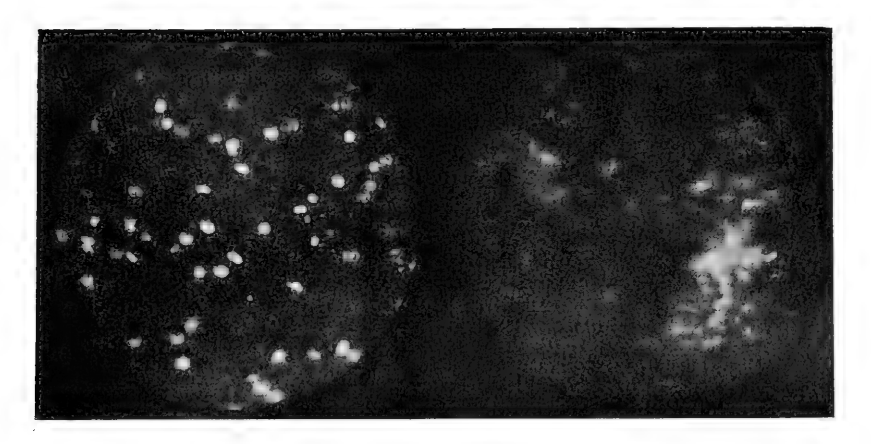
lumineux, qui à leur tour se rassemblent en masses nébuleuses (Voir fig. II, 2, 3 et 4; fig. III, 1 et 3).

Par contre dans les cas où, malgré l'influence des agents physiques, comme les rayons X, d'autres rayons ultra-violets (0,225 μ), le sérum est resté toxique, nous n'avons jamais vu

de changements appréciables (Voir fig. I, 2 et 3; fig. II, 1 et fig. III, 2 et 4).



1. — Sérum congelé. 2. — Sérum chauffé à 56°.

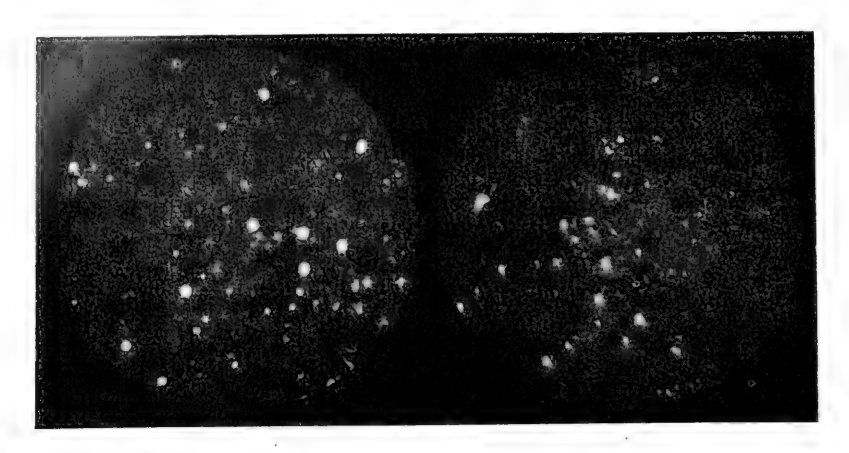


3. — Sérum chauffé à 75°. 4. — Sérum porté à l'ébullition.

Fig. II. — *Influence de la température.*

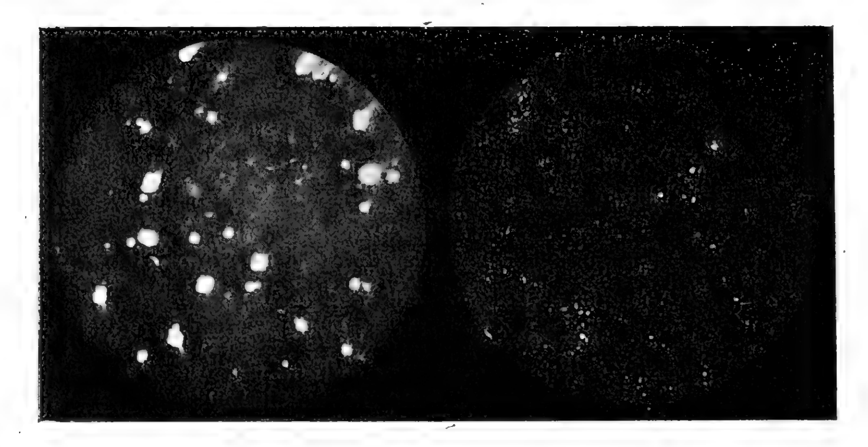
En présence de ces faits nous avons donc été conduit à penser que la toxicité du sérum était liée à sa structure finement micellaire et à chercher si toute action capable de maintenir ou de faire disparaître cette structure n'aurait pas pour effet de maintenir ou d'abolir du même coup la toxicité.

Les recherches de Perrin, Victor Henri [18], Hardy [19], van Bemmelen, Wo. Ostwald, Traube, Michaelis, etc., ont



1. — Sérum irradié par les rayons solaires (48 minutes).

2. — Sérum irradié par les rayons ultra-violets longs (270 minutes).



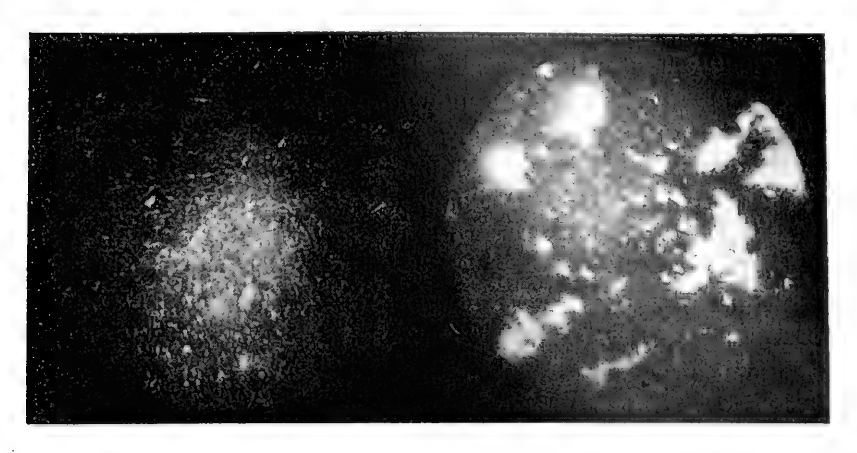
3. — Sérum irradié par les rayons ultra-violets extrêmes (90 minutes).

4. — Sérum irradié par les rayons X (60 minutes).

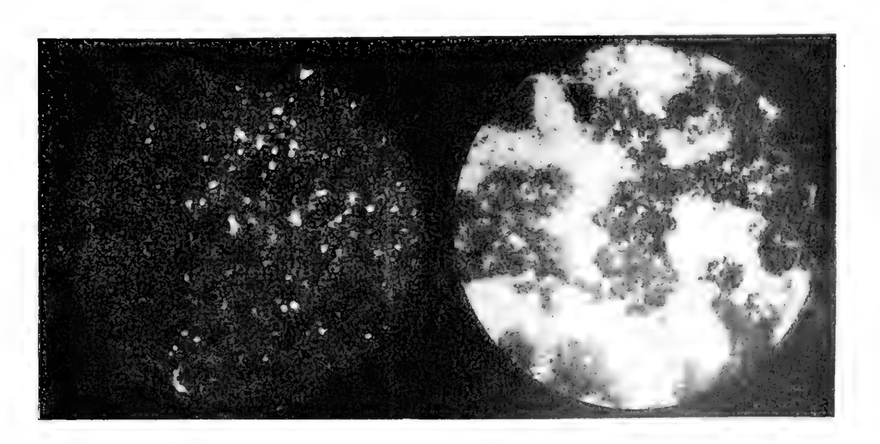
FIG. III. — *Influence des radiations lumineuses.*

montré que la modification de la tension superficielle, de la viscosité des liquides et celle de la charge électrique des micelles sont des agents ordinaires des changements de structure micellaire.

Nous avons donc cherché, en augmentant la viscosité ou en diminuant la tension superficielle du sérum, à empêcher la



1. — Sérum normal du Cobaye. 2. — Sérum du Cobaye en contact 10 minutes avec sérum de la Murène.



3. — Sérum normal du Lapin. 4. — Sérum du Lapin en contact 10 minutes avec sérum de la Murène.

Fig. IV. — *Toxicité* in vitro.

formation d'amas micellaires, provoquée par la température, la lumière ou le temps et nous avons examiné si en même temps on ne pourrait pas obtenir la conservation de la toxicité.

Il va sans dire que les expériences de ce genre, étant donnée

l'introduction dans le sérum des substances étrangères, qui souvent peuvent ne pas être indifférentes au point de vue chimique, sont très délicates, et il fallait multiplier le nombre d'expériences-témoins pour éviter les causes d'erreurs.

Pour augmenter la viscosité du sérum nous nous sommes servi de la glycérine chimiquement pure et d'une solution de saccharose chimiquement pur à 200 p. 100.

Nous avons tout d'abord déterminé l'influence de ces substances sur la tension superficielle de l'eau.

La tension superficielle a été mesurée à l'aide du stalagmomètre de Traube [20] et calculée d'après la formule $\theta = \frac{D \times N}{N'} \times 75$ dynes où D = la densité chaque fois déterminée, N = le nombre des gouttes d'eau pure et N' = le nombre des gouttes du liquide examiné. — Voici les chiffres :

	D	N	θ
1. H^2O à 25° C	0,9960	55,10	74 dynes 70
2. Glycérine à 50 p. 100	1,1320	75,25	62 dynes 25
3. Glycérine à 88 p. 100	1,2372	55,50	92 dynes 02
4. Saccharose à 100 p. 100	1,5578	70,10	91 dynes 65
5. Sérum de la murène	1,0192	93,50	45 dynes 18

La glycérine à la concentration de 88 p. 100 n'a pas pu être utilisée, étant à cette dose toxique elle-même; employée à la concentration de 50 p. 100, elle augmente la viscosité de l'eau environ 70 fois et l'injection intraveineuse de 2 cent. cubes de glycérine, diluée de 2 cent. cubes du sérum bouilli de la murène, n'a pas provoqué d'accidents; l'expérience-témoin avec la saccharose non plus.

Voici maintenant les résultats obtenus avec le sérum de la murène mélangé avec de la glycérine et du saccharose et soumis à l'action de la température de 75° C pendant 15 minutes. Nous rappelons que cette température fait disparaître presque complètement la toxicité sérique.

1.	Sérum glycériné à 50 p. 100 et chauffé à 75° C.	0 c.c. 6 du mélange.	Cob. 350 gr.	Malade; paralysé.
2.		0 c.c. 8	*Id.*	Cob. 310 gr.	Inquiétude; paralysie; dyspnée; secousses; se relève. Survit.
3.		1 c.c. 0	*Id.*	Cob. 360 gr.	Quelques secousses fortes; dyspnée. Survie.
4.		1 c.c. 5	*Id.*	Cob. 325 gr.	Secousses violentes; dyspnée; cris plaintifs; paralysie. Survie.

5.	S. sucré à 100 p. 100 et chauffé à 75° C.	0 c.c. 6 du mélange.	Cob. 450 gr.	Paralysie; tremblements: secousses; dyspnée. Survie.
6.		1 c.c. 2 *Id.*	Cob. 510 gr.	Secousses très nettes et fréquentes; dyspnée forte. Survie.

Ainsi, bien qu'avec les doses très fortes du sérum les symptômes observés aient été des plus graves, il est évident que la toxicité primitive de ce sérum a beaucoup diminué. Mais l'examen du tableau précédent nous révèle que, de ces deux substances, l'une, le saccharose, augmente la tension superficielle, l'autre la diminue; et bien que dans ce dernier cas les deux facteurs concourent à conserver la stabilité micellaire, la mort n'a pas été observée. En tout cas nos résultats sont d'accord avec l'indication donnée depuis longtemps par Calmette que l'addition de la glycérine a pour effet de conserver la toxicité des liquides de cette nature. Nous avons cherché soit à préserver la toxicité sérique de l'action destructive de la température, en diminuant la tension superficielle, soit à faciliter cette destruction en l'augmentant. La difficulté était de trouver deux substances sans influence sur la viscosité et sur la charge électrique des micelles. Finalement, en nous servant d'une suspension de cholestérine à 1 p. 100 et d'une solution d'oléate de soude à 2 p. 100, substances toutes deux électronégatives et sans influence notable sur la viscosité naturelle du sérum, nous avons pu modifier sensiblement la tension superficielle du sérum dans les deux sens.

L'oléate de soude possédait une réaction alcaline; injecté à un cobaye en uantité de 1 centimètre cube en mélange avec 1 centimètre cube de sérum bouilli de la murène, il provoque quelques petits sursauts de tête, l'animal devient normal 2 minutes après. Les doses inférieures n'ont pas été suivies de symptômes appréciables.

La suspension de cholestérine était préparé de la façon suivante : 5 grammes de cholestérine pure cristallisée ont été broyés avec une quantité minime d'eau salée à 7,50 p. 1.000 dans un mortier, puis suspendus dans 100 cent. cubes de cette solution et centrifugés. On enlevait avec précaution la couche médiane, uniformément blanche: on déterminait sa teneur en cholestérine et, en diluant, on a obtenu une suspension à 1 p. 100. Cette suspension de cholestérine, mélangée à parties égales avec le sérum bouilli et injecté en quantité de 1 cent. cube, n'a pas provoqué d'accidents notables.

On a signalé à plusieurs reprises le pouvoir protecteur de la cholestérine dans l'hémolyse, par le venin par exemple [4].

Nous avons fait l'expérience suivante, afin d'être sûr du rôle de la cholestérine et de l'hémolyse dans l'intoxication par le sérum de la murène : on mélange 0 c.c. 2 du sérum de la murène avec 0 c.c. 2 de la suspension de la cholestérine à 1 p. 100 et on injecte le tout à un cobaye de 440 grammes; il est mort instantanément. La conclusion se dégage que le pouvoir hémolytique du sérum de la murène est d'ordre secondaire dans l'intoxication par ce sérum.

Voici maintenant les propriétés physiques de solutions employées et de leurs mélanges avec le sérum de la murène.

Nos	SUBSTANCES	DENSITÉ à 27° C.	N = NOMBRE de GOUTTES au stalagmomètre	TENSION superficielle en dynes	AUGMENTATION (+) OU DIMINUTION (—) par rapport au SÉRUM NORMAL
1.	Eau distillée	0.9955	53,20	74,70	
2.	Eau salée à 7,5 p. 1.000.	0.9961	56,70	72,73	
3.	Oléate de soude à 2 p. 100.	1.1713	144,70	29,33	
4.	Cholestérine à 1 p. 100.	1.0085	56,70	73,65	
5.	Sérum de la murène. .	1.0195	93,80	44,99	1
6.	Sérum du cobaye. . . .	1.0166	59,45	68,76	+ 23,77
7.	Sérum de la murène cholestériné à 0,5 p. 100.	1.0186	88,50	47,90	+ 2,91
8.	Sérum de la murène chauffé à 56° C. et refroidi	1.0188	89,40	46,35	+ 1,36
9.	Sérum savonné à 1 p. 100.	1.0047	126,10	36,93	— 8,06
10.	Sérum savonné et glycériné à 33 p. 100. . .	1.0602	143,15	36,08	— 8,91
11.	Sérum savonné, glycériné et chauffé à 75°.	1.0608	138,95	32,45	— 12,54

Examinons à présent les résultats au point de vue de toxicité de ces différents mélanges; elle était éprouvée en injections intrajugulaires chez les cobayes.

En augmentant d'environ 3 dynes la tension superficielle du sérum de la murène par l'addition de la cholestérine, nous

avons pu inactiver le sérum par le chauffage de 15 minutes à 56°, température à laquelle le sérum normal résiste parfaitement, résultat que précisément nous espérions obtenir.

1.	Cob. 540 gr.	0 c.c. 3	du sérum cholestériné à 0,5 p. 100 chauffé à 56° C.	Pas de réactions caractéristiques.
2.	Cob. 510 gr.	0 c.c. 5		Pas de réactions caractéristiques.
3.	Cob. 480 gr.	0 c.c. 8		Dyspnée légère; tremblem.. Survie.
4.	Cob. 570 gr.	1 c.c. 2		Quelques secousses. Survie.
5.	Cob. 500 gr.	1 c.c. 6		Convulsions et mort en 5 minutes.

Nous avons mélangé le sérum cholestériné à 0,5 p. 100 avec l'oléate de soude à 2 p. 100 en parties égales, soumis le mélange à l'action de la température 56° C et injecté à un cobaye de 510 grammes (0 c.c. 9 de ce mélange = 0 c.c. 3 du sérum de la murène), le cobaye est mort en 11 heures; un autre cobaye de 490 grammes présentait des symptômes très graves d'intoxication.

Inversement, en diminuant d'environ 8 dynes la tension superficielle du sérum de la murène par l'oléate de soude, nous n'avons pas pu, il est vrai, conserver intégralement la toxicité primitive du sérum après le chauffage à 75° C; cependant ce sérum provoque chez le cobaye des symptômes d'intoxication indiscutables, ce qu'on n'observe pas avec le sérum normal chauffé de la même manière.

1.	Cob. 440 gr.	0 c.c. 4	du sérum savonné à 1 p. 100 et chauffé à 75° C.	Secousses légères; paralysies; polypnée; tremblements. Survie.
2.	Cob. 480 gr.	0 c.c. 6		Secousses légères répétées. Survie.
3.	Cob. 450 gr.	1 c.c. 0		Secousses légères répétées. Survie.
4.	Cob. 460 gr.	1 c.c. 4		Secousses fortes; dyspnée; paralysie; tremblements. Survie.

Nous avons combiné l'action du savon avec celle de la glycérine, mais sans pouvoir amener la mort d'animaux même avec des doses 8 fois mortelles du sérum normal.

1.	Cob. 430 gr.	0 c.c. 6	du sérum savonné à 66 p. 100 et glycériné à 33 p. 100 chauffé à 75° C.	Pas de symptômes appréciables.
2.	Cob. 500 gr.	1 c.c. 2		Symptômes légers.
3.	Cob. 510 gr.	2 c.c. 4		Cris plaintifs; émission d'urine; secousses assez violentes; sursauts répétés et forts; tremblements; polypnée. Survie.
4.	Cob. 570 gr.	3 c.c. 3	du sérum savonné à 1 p. 100 et glycériné à 50 p. 100	Secousses violentes immédiates; dyspnée; couché sur le côté; se remet. Survit.

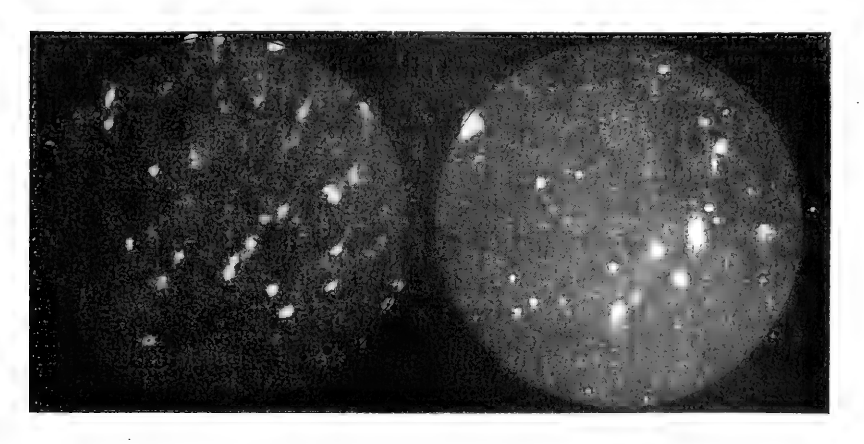
Avec la disparition ou la conservation de la toxicité primitive du sérum de la murène concordaient les résultats ultramicroscopiques, c'est-à-dire l'apparition ou l'absence des agglomérations micellaires (Voir fig. IV).

Discussion.

Essayons de grouper tout d'abord les faits observés. Nous avons constaté l'apparition des agglomérations micellaires chaque fois que, sous l'influence des différents agents physiques, le sérum de la murène perdait ses propriétés toxiques. Cette constatation nous a suggéré l'hypothèse que la toxicité sérique est liée à l'état d'agrégation des micelles de ce liquide. Dans ce cas trois facteurs peuvent intervenir pour faciliter ou empêcher la formation des agrégats de ces micelles : la viscosité, la tension superficielle et la charge électrique. Et en effet, nous avons démontré qu'en modifiant la viscosité ou la tension superficielle du sérum de la murène, soumis à l'influence des agents physiques destructifs, on peut dans une certaine mesure faciliter ou gêner l'apparition des agglomérations micellaires et, *ipso facto*, faciliter ou gêner la disparition de la toxicité sérique.

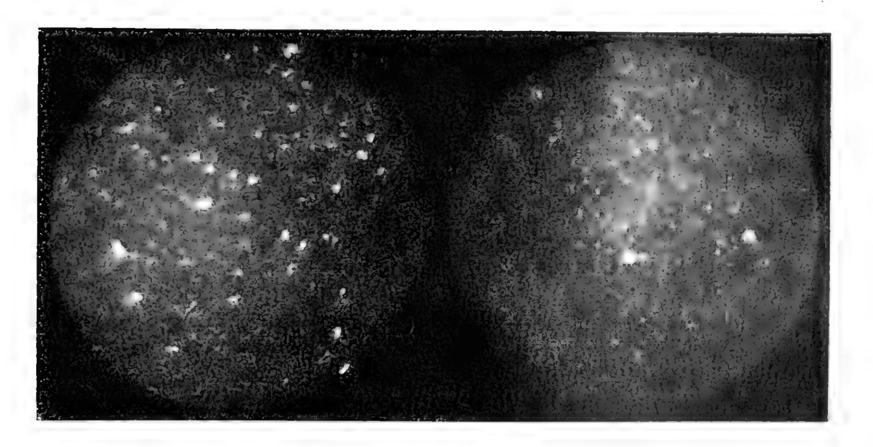
En examinant le sérum de cobayes intoxiqués par le sérum de murène, nous avons vu que sa tension superficielle n'est que de 65,22 dynes au lieu de 68,90 pour le sérum normal. Un fait analogue a été observé par Cosmovici [**5**] pour le sérum de congre ou d'anguille. Nous avions fait une observation semblable après le choc provoqué par l'anaphylatoxine [**21**]. Bien que l'intoxication ait lieu par mélange du sérum toxique avec le sang complet de l'animal *in vivo*, nous inclinons à rapprocher les constatations faites sur le sérum, des faits bien connus de baisse de tension superficielle qui, dans les suspensions colloïdales, accompagne la précipitation des micelles. Une telle précipitation peut d'ailleurs être observée directement à l'ultra-microscope quand on mélange le sérum de la murène avec du sérum frais de lapin par exemple (Voir fig. V, 1, 2, 3 et 4). D'autre part, le sérum d'un animal intoxiqué se montre presque vide optiquement comme celui du lapin après le choc anaphylactique.

Quelles relations sommes-nous conduit à supposer entre le venin et le sérum de la murène? La toxicité du sérum n'im-



1. — Sérum sucré à 100 % et chauffé à 75°.

2. — Sérum glycériné à 33 % et chauffé à 75°.



3. — Sérum savonné et chauffé à 75°.

4. — Sérum savonné, glycériné à 33 % et chauffé a 75°.

Fig. V. — *Influence de la tension superficielle et de la viscosité.*

plique-t-elle pas l'existence d'un appareil venimeux?

Gley [22], Camus et Gley [23], Briot [24] ont observé la toxicité du sérum de divers poissons venimeux : lamproie, raie, torpille; on connaissait celle de l'anguille et du congre.

Nous avons vérifié la toxicité du sérum de la raie, décrite par Camus et Gley et nous avons expérimenté le sérum de la roussette, qui s'est montré pourvu d'une toxicité assez accentuée.

Cependant, chez les poissons cités, à l'exception du congre et de l'anguille, appartenant à la même famille que la murène, cette toxicité n'est jamais si foudroyante. Donc là où il y a un appareil venimeux, la relation doit être assez étroite entre la toxicité du sérum sanguin et celle du venin; c'est ce qu'on pouvait induire des expériences de Calmette [4] qui a constaté que le sérum anticobra préserve en même temps contre la toxicité du sang.

Nous avons aussi immunisé des lapins contre 9 à 15 doses mortelles du sérum de la murène et le sérum obtenu possédait des propriétés préventives contre le venin et contre le sérum de la murène.

Phisalix et Bertrand [1] concluaient des expériences de Calmette à la présence du venin dans le sang de serpents grâce à une sécrétion interne; Calmette n'acceptait pas cette hypothèse, étant donné que le sérum perd ses propriétés toxiques après le chauffage à 60°, tandis que le venin résiste parfaitement à cette température.

En ce qui concerne le sérum de la murène, nous avons constaté que non seulement le venin est de beaucoup plus thermostabile que le sérum, mais que les symptômes d'intoxications et le tableau à l'autopsie diffèrent sensiblement. Nous savons en plus que le venin est précipitable par l'alcool; or, après la précipitation du sérum par l'alcool, on retrouve les propriétés toxiques dans le filtrat [25].

Ce n'est donc pas le venin tel que, qui se trouve dans le sang. Est-ce donc, comme le veut Calmette, une substance diastasique qui en même temps serait une partie essentielle dans la constitution complète du venin des serpents?

Nous savons que les diastases sont précipitables par l'alcool, qu'une action diastasique en absence d'électrolytes est improbable (Bertrand) et qu'en tout cas le facteur temps est essentiel dans les réactions diastasiques. Or le choc toxique, provoqué par le sérum de la murène est pour ainsi dire instantané; le sérum dialysé est toxique après la précipitation par

l'alcool; ce n'est pas le précipité qui est toxique, mais bien le filtrat. Eliminons donc une action diastasique d'un ferment hypothétique.

Résumons : une relation entre le venin et la toxicité du sérum de la murène est indiscutable. Est-elle due à une substance qui intervient ici et serait-ce une substance dans le genre des proferments; un provenin? Nous n'en savons rien, et nous n'en voyons aucun indice précis.

Dans tous les cas, la toxicité d'une telle substance hypothétique serait liée à sa structure physique et à ses propriétés colloïdales. Ce fait est nettement établi par les expériences sur la tension superficielle, la viscosité et la structure *micellaire* des sérums expérimentés.

Conclusions.

1° Le sérum de la murène est éminemment toxique. Une dose suffisante provoque la mort instantanée. La dose mortelle est de 0 c.c. 2 pour des cobayes, 0 c.c. 5 pour des lapins et 0 c.c. 1 pour des chiens par kg-corporel.

2° Le sérum normal de la murène possède des propriétés hémolytiques très accentuées; chauffé à 56° pendant un quart d'heure, il perd ces propriétés et la solution de lécithine ne peut remplacer le complément détruit.

Ses propriétés bactériolytiques ne sont pas très marquées, seul le staphylocoque doré est dissous après un contact prolongé.

Le sérum étudié ne possède pas de propriétés agglutinantes ni précipitantes.

3° Le sérum de la murène possède la propriété remarquable de garder sa toxicité même après 30 jours de conservation à l'obscurité.

4° Les rayons solaires exercent une action destructive nette. Les rayons ultra-violets de longueur d'onde comprise entre 300 $\mu\mu$ et 400 $\mu\mu$ sont sans action; par contre les rayons ultra-violets extrêmes détruisent la toxicité sérique rapidement. Les rayons X sont sans aucune influence.

5° La température de congélation est sans effet sur la toxicité, cette toxicité disparaît au voisinage de 65° C.

6° Des essais d'absorption par les poudres n'ont donné aucun résultat.

7° On peut dessécher le sérum de la murène sans affaiblir d'une façon appréciable ses propriétés toxiques.

8° La toxicité du sérum persiste après une dialyse prolongée.

Le sérum dialysé peut être précipité par l'alcool, sans perdre complètement ses propriétés toxiques.

9° Le sérum de la murène peut être débarrassé d'environ 3 p. 100 de ses matières sèches en le précipitant par l'alcool absolu, mais on affaiblit moins fortement ses propriétés toxiques.

Le sérum ainsi traité et desséché dans le vide perd ses propriétés toxiques.

10° Le *venin* de la murène est mortel à la dose de 1 milligr. 5 pour un cobaye d'un poids de 400 à 500 grammes.

Ce venin est remarquablement thermostabile; après un chauffage de 15 minutes à 75°, il possède encore ses propriétés toxiques; seule la température d'ébullition fait disparaître sa toxicité.

Le venin de la murène a un pouvoir hémolytique assez accentué qu'il conserve même après le chauffage à 75° C.

11° Le sérum du lapin immunisé contre 9 ou 15 doses mortelles du sérum de la murène possède des propriétés antitoxiques; il neutralise *in vitro* la toxicité du sérum de murène auquel on l'ajoute en proportion de 20 doses pour une dose mortelle; son pouvoir préventif est équivalent.

Le sérum antitoxique est en même temps antivenimeux, mais ce pouvoir antivenimeux est beaucoup plus faible : il faut 90 doses du sérum antitoxique pour neutraliser une dose mortelle du venin.

12° Chaque fois que le *sérum* de la murène, soumis à l'influence des agents physiques tels que la chaleur, les rayons ultra-violets extrêmes ou la conservation prolongée, a été inactivé, on observe des changements profonds dans sa structure ultra-microscopique; les micelles, séparées et en mouvement brownien vif, se groupent par plusieurs, tout en perdant leur mouvement.

Une véritable précipitation ultra-microscopique a lieu, si on

mélange le sérnm de la murène avec le sérum d'un animal d'expérience.

13° En modifiant soit la viscosité, soit la tension superficielle du sérum de la murène, soumis à l'influence des agents physiques destructifs, on peut à volonté faciliter ou retarder l'apparition des agglomérations micellaires et *ipso facto* faciliter ou retarder la disparition de cette toxicité sérique.

Après l'intoxication des animaux d'expériences par le sérum de la murène, la tension superficielle de leur sérum baisse, l'ultra-microscope ne décèle plus de micelles de même grandeur que dans le sérum normal.

14° Le sérum de quelques poissons non venimeux : roussette, raie, torpille, s'est montré toxique pour les cobayes, mais cette toxicité est de beaucoup inférieure à celle du sérum de la murène.

15° Cette dernière semble être en relations étroites avec le venin, ainsi que le prouvent les propriétés antivenimeuses du sérum de lapin immunisé contre le sérum.

16° La toxicité extraordinaire du sérum de la murène n'est pas due à la présence du venin tel que, dans le sang; parce que ce sérum perd sa toxicité presque totalement après le chauffage à 65°, tandis que le venin résiste à cette température.

17° Ce n'est pas une substance diastasique dans le sens de Calmette, étant donnée la toxicité du sérum dialysé ou précipité par l'alcool.

18° Etant donnée la toxicité du sérum des poissons non venimeux, il faut plutôt admettre que la toxicité du sérum de la murène est liée à sa structure micellaire, de sorte que l'injection de ce sérum dans le sang hétérogène provoque un changement d'état d'agrégation qui se traduit par l'apparition d'agglomérations micellaires. L'abaissement de la tension superficielle du sérum de l'animal intoxiqué nous paraît en relation avec ce phénomène. La toxicité du sérum de la murène et celle de son venin paraissent être en relation étroite. La nature de cette relation reste à éclaircir.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

[1] PHISALIX et BERTRAND. — *Archives de Physiologie*, 1894, et *Revue gén. des Sciences*, 1896.
[2] CALMETTE. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1894.
[3] MOSSO. — *Arch. italiennes de Biologie*, 1888 et 1889.
[4] CALMETTE. — Les venins. WINTERSTEIN. *Hand. d. vergl. Physiol.*, II, FREDERICQ. *Schutzstoffe*, p. 166.
[5] COSMOVICI. — Thèse de la Faculté des sciences de Paris, 1915.
[6] GRIMARD et DUMAREST. — *Comptes rendus de la Soc. de Biol.*, 1897, p. 415.
GLEY et CAMUS. — *Recherches sur l'action physiologique des ichtyotoxines*, 1912.
WEHRMANN. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1897, p. 810.
[7] V. HENRI, A. HELBRONNER et M. DE RECKLINGHAUSEN. — *C. R.*, 11 avril 1910.
[8] KOPACZEWSKI. — *C. R.*, 1913.
[9] TCHISTOVITCH. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899, p. 406.
[10] SLATINEANU et CIUCA. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1193, t. I, p. 631.
[11] THIELE und EMLETIEN. — *Zeitsch. f. Immunitätsforsch.*, 1913, vol. 20, p. 159.
[12] NOVY and DEKRUIF et coll. — *The Journal of Inf. Diseases*, 1917, vol. 20, p. 499, et suiv.
[13] KOPACZEWSKI et MUTERMILCH. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1914, vol. LXXVII, p. 392.
[14] A. MAYER. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, vol. LXIII, 1917, p. 42, 184 et 553.
[15] BOTTAZZI. — *Rend. R. Ac. de Lincei*, vol. 19, 1910, p. 659.
[16] CEZANA. — *Archiv. di Fisiol.*, V, 4, 1907, p. 327.
[17] PERRIN. — *Les Atomes*, Alcan, Paris, 1913, p. 230 et suiv.
[18] V. HENRI et A. MAYER. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1906, t. II, p. 435.
[19] HARDY. — *Journal of Physiol.*, 1889, vol. 24, p. 301.
[20] TRAUBE dans ABDERHALDEN. — *Hand. d. bioch. Arbeitsmethoden*, vol. 5, p. 1357.
[21] KOPACZEWSKI et MUTERMILCH. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, vol. 77, 1914, p. 417.
[22] GLEY. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, vol. LXXVIII, p. 116-118.
[23] GLEY et CAMUS. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1915, vol. LXXVIII, 203.
[24] BRIOT. — *Arch. Physiol.*, 1903, vol. V, p. 271.
[25] KOPACZEWSKI. — *Bulletin de l'Institut océanogr.*, 1917; *C. R.*, juin-octobre 1917; — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, octobre-décembre 1917.

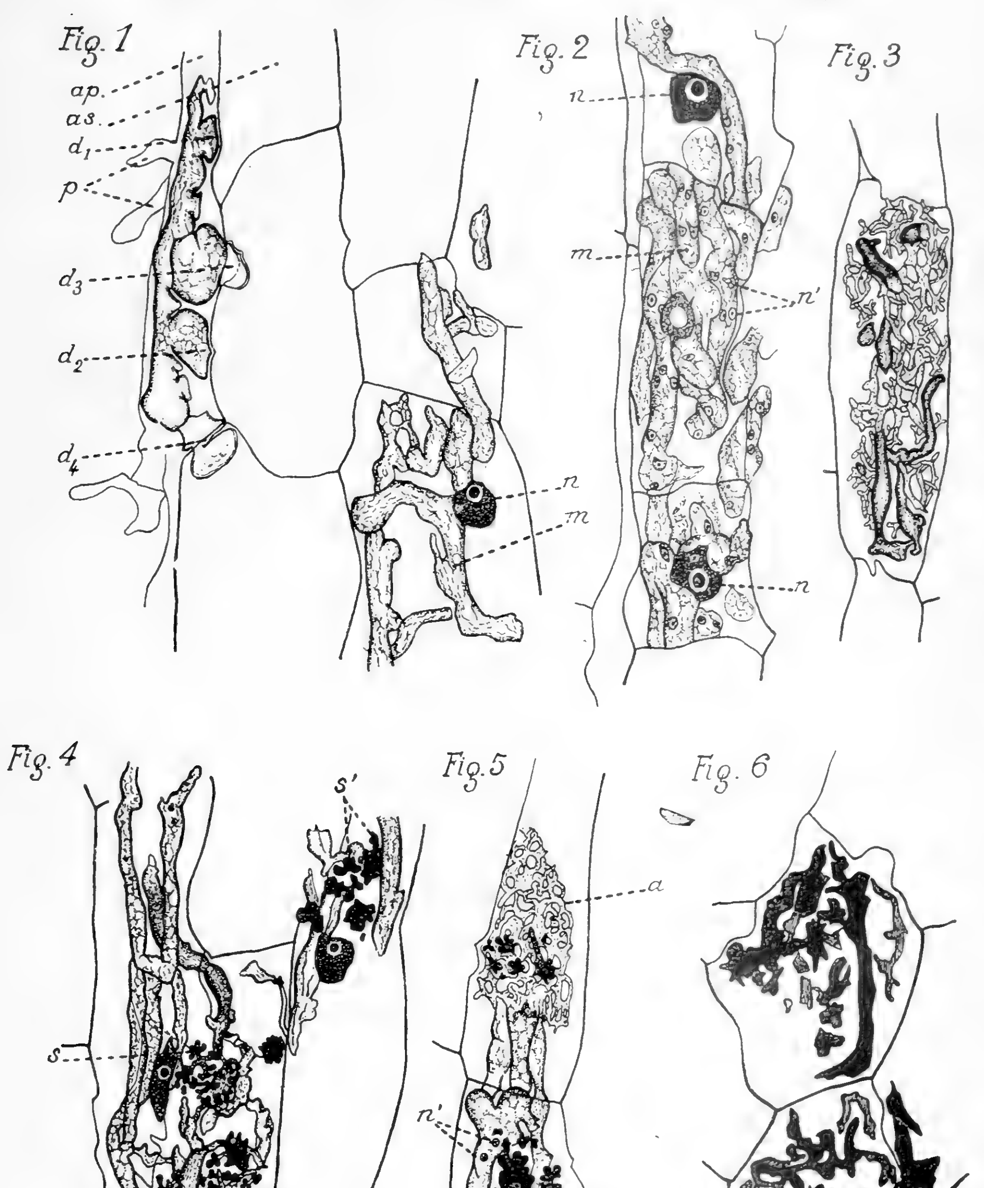
TABLE DES MATIÈRES

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

TABLE DES PLANCHES

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.



J. Magrou, del.

Racines de *Solanum tuberosum* envahies par un champignon endophyte.

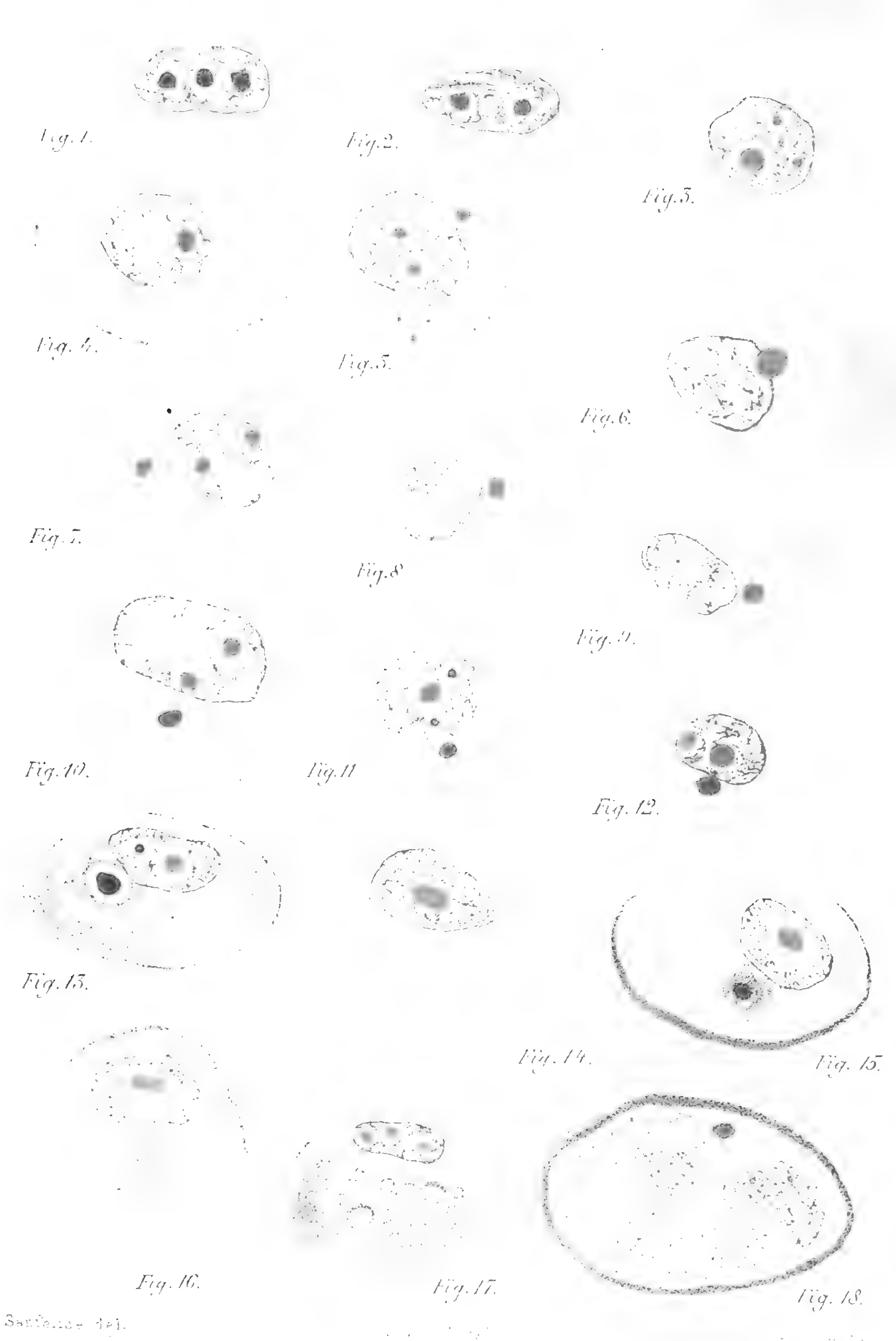
L. Maretheux, imp.

(Mém. E. Malvoz et J. Lambinet.)



Coupe à travers la peau du chien, enlevée une heure après le dépôt de larves d'ankylostomes sur la peau.

1, 1'. Larves engagées dans la gaine épithéliale d'un follicule pileux.



Sanfelice del.

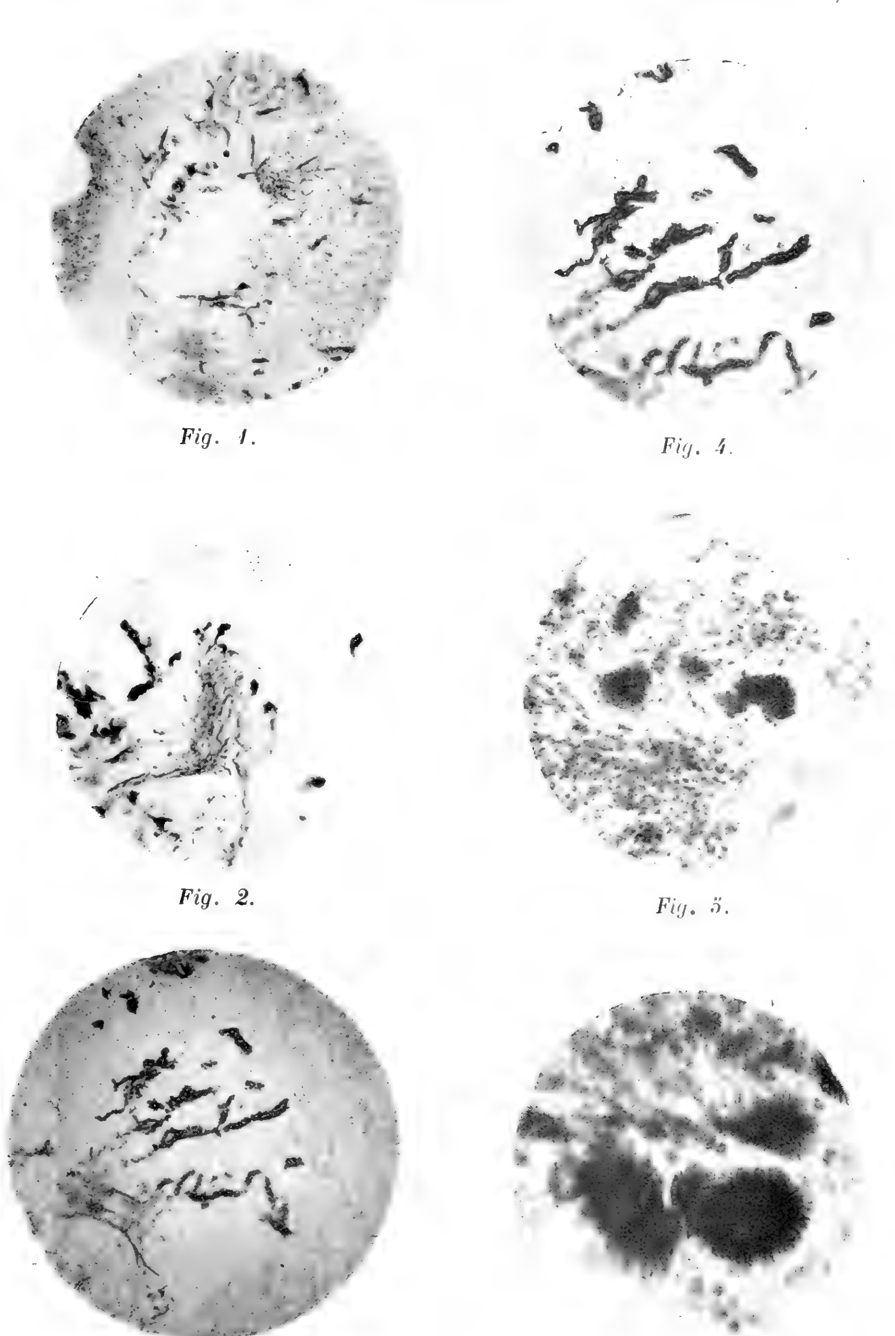


Fig. 1.

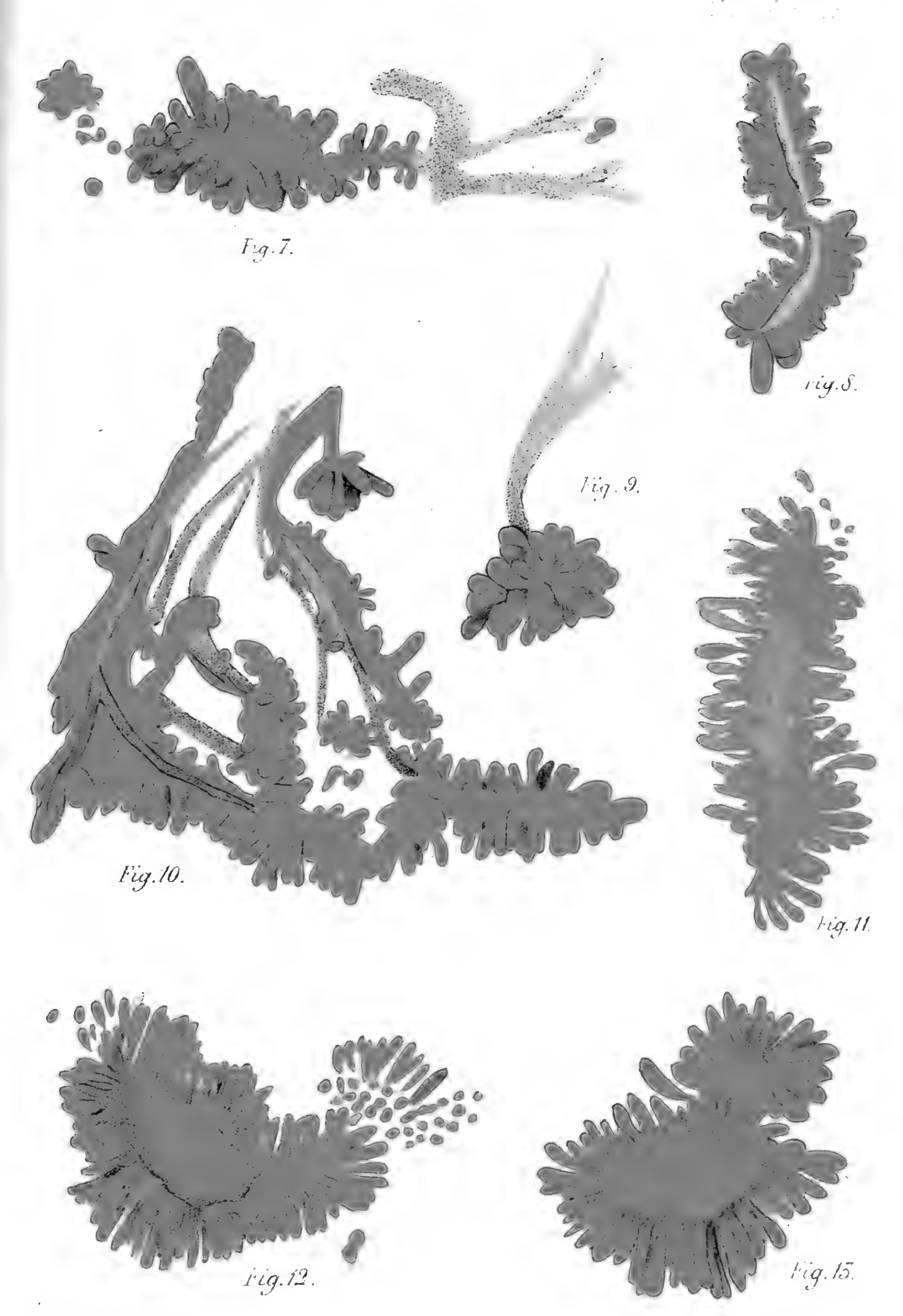
Fig. 4.

Fig. 2.

Fig. 5.

Fig. 3.

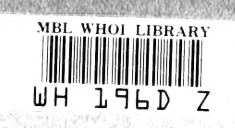
Fig. 6.



Jensen del.



Jensen del.   Imp. L. Lafontaine


MBL WHOI LIBRARY
WH 196D Z